

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Genética



TESIS DOCTORAL

**SKP2B : un nuevo marcador para el estudio del desarrollo
radicular**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Concepción Manzano Fernández

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

MAN
SKP

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

FACULTAD DE BIOLOGÍA



627628097

**SKP2B UN NUEVO MARCADOR PARA
EL ESTUDIO DEL DESARROLLO
RADICULAR**



40990692

**TESIS DOCTORAL
CONCEPCIÓN MANZANO FERNÁNDEZ
Madrid, 2011**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE
MADRID**

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

FACULTAD DE BIOLOGÍA



CONCEPCIÓN MANZANO FERNÁNDEZ

MADRID, 2011

A mi madre,

Creer posible algo es hacerlo cierto.

Friedrich Hebbel (1813-1863)

Es difícil comenzar otra hoja en blanco y tanto que agradecer y a quienes recordar. Quizá lo mejor sea empezar por el principio o por lo menos mi principio. No puedo decir que la ciencia fuera mi vocación desde siempre pero sí que fue una ilusión que fue inundando mi cabeza y poco a poco una forma de entender el mundo. Cuando me di cuenta que la genética formaba parte de lo que quería saber y a lo que podía dedicarme no tuve duda. Esta certeza implicaba cambiar de ciudad y algún que otro sacrificio. La primera persona a la que quiero agradecer el comienzo de mi ilusión es a Juan Martínez que hizo posible mi viaje a Madrid. También quiero agradecer a Sara que por una suerte del destino me llevó al laboratorio de Pilar Cubas. Quiero agradecer a Pilar y a Jose Antonio todo el conocimiento que me brindaron y su calidad humana. También quiero agradecerles que me pusieran en contacto con J. Carlos porque eso sí que ha sido una suerte. En estos años he conocido a muchas personas sin las que esta tesis no hubiera sido lo mismo así que intentaré no olvidar a nadie. Quiero agradecer a los laboratorios de Rosa, F. Ponz, Escribano, Jarillo/Manolo, Salinas y en especial: a Gemita y a Claudia por su gran corazón, a Ana por su ayuda, cordura y sensatez, a Angelita por su alegría y optimismo ¡y por los ranchitos!, a Lauri por estar ahí siempre (y por compartir Lost conmigo), a Leti porque siempre ha estado dispuesta a ayudarme ¡Aunque también a ser el centro de las reuniones! y a Sandri por su cariño. De los chicos al Pollito porque parece que está desde siempre, a Pablo por su buen carácter, a Iván por sus rodeos y a Deivid por su generosidad. Tampoco quiero olvidarme de agradecer a la división CBGP: A Mar, Paloma, Cristina, Irene, Ángela, MªMar, Alicia, Ruth...y a todos los que me habéis ayudado en algún momento.

Quiero agradecer en un apartado especial a las personas que han formado parte de mi laboratorio: A Viky por cuidarnos como sus “niñas” y por tener una familia muy especial, a Zami por su gran corazón, por estar siempre y por ayudarme en mis comienzos, a Silvia porque siempre estuvo cuando la necesité, por su buen carácter, porque sin ella no hubiera sido lo

mismo y por nuestras pequeñas disputas familiares “¿El 2A es mejor... no es el 2B!”, a Gema por su cariño y valentía, a Sara porque es un bálsamo de paz y amor de los que no se encuentran fácilmente, a Elena por su ayuda y por darme ánimo, a Kata por ser un soplo de aire fresco y por los ratos de cine! y en los últimos tiempos a las nuevas generaciones Bárbara y Mercedes. En unas líneas aparte tengo que agradecer a Carlos por su calidad humana y científica, porque siempre he contado con su apoyo y porque se ha convertido en un referente para mí, *gracias*. No me puedo olvidar de agradecer a la división del laboratorio “Ignacio”: a Nacho para que vea que tanto preguntarme por la tesis ha surtido efecto, a Julieta y a David.

Y en otro apartado quiero agradecer a las personas más importantes para mí ya que sin ellas esto no habría sido posible. A mi madre que es mi pilar y la mejor persona que he conocido, por su lucha y porque sin ella no sería la persona que soy, a mis abuelos que estarán siempre, a mi hermana que me apoya y me enseña día tras día, a mi hermano por estar siempre conmigo y por la llegada a Madrid, a Edu que es mi segundo hermano y que siempre, siempre está dispuesto a ayudarme con una sonrisa, a Belén por su cariño, a Adriana de la que estoy muy orgullosa y a Peter que es mi compañero incondicional, que me escucha siempre, porque formamos un gran equipo y porque esta tesis tampoco habría sido lo mismo sin ti. Quiero agradecer también a mis amigas de siempre por su apoyo y ánimo en los momentos duros y por estar conmigo dándome su cariño sin que importe la distancia: A Natalie, Rachel, Kitty y Gema.

Gracias a tod@s!!!

RECONOCIMIENTOS

Quiero agradecer por la ayuda en la elaboración de esta tesis: a Ilda Casimiro y Pedro Casero por la ayuda en el análisis fenotípico de los mutantes *sbrel50*, *sbrel52*, *tmo7*, *fez*, y *rap2.3*. A Crisanto Gutiérrez y Elena Ramírez por los experimentos de Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP). A Bert de Rybel y Tom Beeckman por los experimentos de cell sorting.

ÍNDICE	Página
ABREVIATURAS Y SIGLAS	1
RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1 FORMACIÓN DE RAÍCES LATERALES.	8
<i>1.1.1 Eventos de preiniciación de formación RL. Activación de células del periciclo.</i>	10
<i>1.1.2 Regulación de la distribución de las células fundadoras del periciclo.</i>	13
<i>1.1.3 Regulación de la formación de RL.</i>	15
<i>1.1.4 Desarrollo de los primordios de raíces laterales.</i>	20
<i>1.1.5 Emergencia del primordio de RL.</i>	24
<i>1.1.6 Activación del meristemo de la raíz lateral y elongación.</i>	28
<i>1.1.7 Otras hormonas implicadas en la formación de RL.</i>	29
1.1.7.1. Citoquininas.	29
1.1.7.2. Acido Abscísico.	31
1.1.7.3. Brasinoesteroides.	32
1.1.7.4. Giberelinas.	33
1.1.7.5. Etileno.	33
1.1.7.6. Interacciones hormonales.	35
<i>1.1.8 Remodelación de cromatina.</i>	36
1.2 LA RUTA DE LA UBIQUITINA EN PLANTAS.	37
1.3 <i>Arabidopsis thaliana</i> COMO ORGANISMO MODELO PARA EL ESTUDIO DE LA FORMACIÓN DE RAÍCES LATERALES EN PLANTAS.	41
2. OBJETIVOS.	47
3. MATERIALES.	51
3.1 MATERIAL VEGETAL.	51
3.2 CEPAS BACTERIANAS Y LEVADURAS.	51
3.3 MEDIOS DE CULTIVO.	51
3.4 VECTORES Y OLIGONUCLEÓTIDOS.	52

3.5 SOLUCIONES Y TAMPONES.	55
4. MÉTODOS.	61
4.1 AISLAMIENTO Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.	61
<i>4.1.1 Extracción y análisis de ADN.</i>	61
<i>4.1.2 Extracción y análisis de ARN.</i>	61
4.2 CONDICIONES DE CULTIVO.	62
4.3 UN HÍBRIDO.	63
4.4 DOBLE HÍBRIDO.	64
4.5 ENSAYOS DE LACZ E HIS3.	64
4.6 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.	65
4.7 EMSA.	65
4.8 INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (ChIP).	66
4.9 CELL SORTING Y ANÁLISIS DE MICROARRAY EN CÉLULAS SKP2B:GFP.	66
4.10 CULTIVOS DE CÉLULAS SINCRONIZADAS.	67
4.11 CITOMETRÍA DE FLUJO.	67
4.12 MATERIAL VEGETAL Y TRANSGÉNICAS.	67
4.13 TINCIÓN HISTOQUÍMICA GUS.	69
4.14 ENSAYO UNIÓN AUXINA.	69
4.15 ENSAYO AUTOUBIQUITINACIÓN.	70
4.16 UBIQUITINACIÓN <i>IN VITRO</i>.	70
4.17 UBIQUITINACIÓN DIANAS XBAT32.	71
5. RESULTADOS.	75
5.1 FUNCIÓN DE SKP2B.	75
<i>5.1.1 Regulación de SKP2B a lo largo del ciclo celular.</i>	75
<i>5.1.2 SKP2B es una proteína nuclear.</i>	76
<i>5.1.3 Análisis del complejo SCF^{SKP2B}.</i>	76
<i>5.1.4 Unión de SKP2B a auxina.</i>	77
<i>5.1.5 SKP2B se expresa en estadios tempranos de formación de RL.</i>	78
<i>5.1.6 Análisis del mutante <i>skp2b</i> en el desarrollo del sistema radicular.</i>	81
<i>5.1.7 Análisis del doble mutante <i>skp2brkp</i> en el desarrollo del sistema radicular.</i>	83
5.2. SKP2B COMO UN MARCADOR DE LAS CÉLULAS FUNDADORAS DE RL.	84
<i>5.2.1 Identificación de un nuevo motivo específico de raíz.</i>	84
<i>5.2.2 Expresión de la proteína silvestre IAA14 y la proteína mutante <i>mIAA14</i> bajo el promotor de gen SKP2B 0.5Kb.</i>	87

5.2.3 <i>Papel de SKP2B en la respuesta a auxina.</i>	88
5.3. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE SKP2B.	89
5.3.1 <i>La expresión de SKP2B está regulada por el factor de transcripción RAP2.3.</i>	90
5.3.2 <i>El intercambio de histonas mediado por CAF regula la expresión de SKP2B.</i>	92
5.3.3 <i>Regulación hormonal de la expresión de SKP2B.</i>	99
5.3.4 <i>La expresión de SKP2B en las células fundadoras es dependiente de la señalización de auxina.</i>	101
5.3.5 <i>La expresión de SKP2B esta alterada en el mutante <i>skp2b</i>.</i>	106
5.4 SKP2B COMO HERRAMIENTA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE GENES IMPLICADOS EN EL DESARROLLO RADICULAR EN <i>Arabidopsis</i>.	107
5.4.1 <i>Identificación de genes que participan en el desarrollo del sistema radicular.</i>	111
5.5 BÚSQUEDA E IDENTIFICACIÓN DE MUTANTES CON UN PATRÓN DE EXPRESIÓN DE SKP2B ALTERADO.	113
5.5.1 <i>Mutante <i>sbrel52</i>.</i>	115
5.5.1.1 <i>Caracterización fenotípica del mutante <i>sbrel52</i>.</i>	115
5.5.1.2 <i>Mapeo del mutante <i>sbrel52</i>.</i>	117
5.5.1.3 <i>Actividad ubiquitina ligasa de XBAT32.</i>	119
5.5.1.4 <i>Identificación de proteínas diana de XBAT32.</i>	119
5.5.2 <i>Mutante <i>sbrel50</i>.</i>	123
5.5.2.1 <i>Caracterización fenotípica del mutante <i>sbrel50</i>.</i>	123
5.5.2.2 <i>Expresión de marcadores de raíz en el mutante <i>sbrel 50</i>.</i>	127
5.5.2.3 <i>Mapeo del mutante <i>sbrel50</i>.</i>	128
6. DISCUSIÓN.	133
7. CONCLUSIONES.	159
8. ANEXO.	165
9. BIBLIOGRAFÍA.	177

ABREVIATURAS Y SIGLAS

ABA Ácido Abscísico.

ATP Adenosín Trifosfato.

CF Células fundadoras.

GFP Proteína verde fluorescente.

H Hora.

Kb Kilobase.

MB Meristemo basal

Min Minuto

mm Milímetro.

PRL Primordio de raíz lateral.

PIRL Puntos de iniciación de RL.

RL Raíces laterales.

RESUMEN

Resumen

Las plantas son organismos sésiles que deben adaptar su crecimiento a diferentes cambios ambientales. El sistema radicular juega un papel crucial en la adaptación de las plantas al medio ambiente, ya que suministra nutrientes y agua, además de proporcionar anclaje al suelo. Las raíces tienen la capacidad de crecer casi indefinidamente gracias a su capacidad de formar nuevos órganos (Raíces laterales) a lo largo de su vida. Las raíces laterales se forman a intervalos regulares a lo largo de la raíz mediante el marcaje/especificación de las células fundadoras en el meristemo basal, en un mecanismo dependiente de auxina. En este trabajo hemos demostrado que *SKP2B*, una proteína de tipo F-box implicada en la división celular, actúa como represor de la formación de RL.

Hasta la fecha el mejor marcador de la especificación y el desarrollo de las RL ha sido el marcador de respuesta a auxina DR5:GUS. En este trabajo presentamos a nuevo marcador, *SKP2B*:GUS, que tiene la ventaja de reflejar las diferentes señales internas y externas así como marcas epigenéticas que afectan tanto al número como al desarrollo de las raíces laterales. Esto le convierte en un marcador ideal para el estudio de la formación de raíces laterales desde la especificación de las células fundadoras hasta la emergencia de la raíz lateral. Utilizando la expresión específica de *SKP2B*:GFP y la separación celular de protoplastos con expresión para GFP hemos llevado a cabo un perfil transcriptómico, identificando más de 200 genes con posible papel en la formación de las raíces laterales. Finalmente, usando plantas *SKP2B*:GUS hemos identificado una colección de mutantes que manifiestan diferentes alteraciones en el desarrollo radicular.

Abstract

Plants are sessile organisms that have to adapt their growth to different environmental clues. Plant root system can grow almost indefinitely due to their ability to branch new organs (lateral roots) throughout their entire life. Lateral roots are formed at regular intervals along the main root by recurrent and auxin dependent specification of founder cells in the basal meristem. We show that SKP2B, a cell cycle F-box, represses lateral root formation.

At present, the best molecular marker to follow and study this specification and lateral root formation is the DR5:GUS marker, which reflects the maxima auxin response. Here we present a new, reliable and specific marker, SKP2B:GUS, to study lateral root development from the specification of the founder cells to the emergence of the lateral organ. One advantage of this marker is that it responds to internal-genetic clues, epigenetic marks and also to external stimuli. Using a SKP2B-specific expression profiling in roots, via cell sorting of GFP-protoplasting and mutant analyses, we have identified new genes involved in lateral root development. Finally, using *SKP2B*:GUS plants we have identified a set of mutants which show several alteration in root development.



INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos sésiles que deben adaptar su crecimiento al medio que las rodea. Para ello, estos organismos disponen de un desarrollo post-embrionario que les permite modular el crecimiento. La capacidad de crecimiento de una planta reside en la tasa de división celular y posterior diferenciación de las células meristemáticas. En estos meristemos residen un grupo de células madre que son capaces de dividir constantemente a lo largo de toda la vida de la planta y generar todas las líneas celulares necesarias para su correcto desarrollo. El éxito de las plantas, depende en gran medida, de su adaptación a los diferentes ambientes a los que está sometida durante su crecimiento. Por ello, la división celular en los meristemos está sujeta a continuos cambios que modulan su tasa de proliferación.

Debido a su incapacidad para desplazarse, el desarrollo y la función del sistema radicular son cruciales para estos organismos. La disponibilidad de agua y nutrientes, tales como el nitrato (Zhang y Forde, 2000), el fosfato (Lopez-Bucio *et al.*, 2002) o el sulfato (Maruyama-Nakashita *et al.*, 2004), son algunos de los factores limitantes para el crecimiento en todos los ecosistemas, y su adquisición determina la capacidad de las plantas para poder mantener la proliferación celular, el crecimiento y en última instancia su eficiencia reproductiva (Lopez-Bucio *et al.*, 2003). La formación de raíces laterales es un proceso organogenético de gran importancia que contribuye al establecimiento de la arquitectura de la raíz en plantas superiores (Fukaki *et al.*, 2009). La raíz es el órgano que permite la absorción de agua y nutrientes, da soporte estructural, y ancla la planta al suelo. Además participa en las interacciones con el ambiente biótico del suelo.

La morfología de la raíz está determinada genéticamente y puede variar de una especie a otra. Sin embargo, el desarrollo y arquitectura final del sistema radicular está fuertemente influenciada por el ambiente. El carácter sésil de las plantas se traduce en una alta plasticidad en los fenotipos del sistema radicular que se puede encontrar en la naturaleza. Las plantas son capaces de modular su sistema radicular para obtener una

mayor adaptación a los medios con baja disponibilidad de nutrientes y agua, incrementando la superficie de absorción, gracias a un mayor número de raíces laterales y de pelos radiculares. El patrón de desarrollo radicular está controlado por factores endógenos (dominancia apical, número y posición de raíces laterales) y exógenos (la presencia de nutrientes y agua, la gravedad o la intensidad y calidad de la luz) (Woodward *et al.*, 2005).

Las plantas superiores exhiben una gran diversidad de arquitecturas radiculares tanto a nivel anatómico como de sistema (Lloret *et al.*, 2002). Muchas dicotiledóneas como *Arabidopsis* desarrollan raíces laterales a partir de la raíz principal mientras que algunos cereales como el maíz (*Zea mays*) o el arroz (*Oryza sativa*) tienen un sistema radicular compuesto principalmente por raíces adventicias (Hochholdinger *et al.*, 2004, Osmont *et al.*, 2007). En estudios genéticos recientes se han identificado numerosos genes con funciones comunes tanto en desarrollo de raíces laterales como en raíces adventicias (Hochholdinger *et al.*, 2004). A pesar del gran progreso en el estudio del desarrollo radicular en cereales, *Arabidopsis* sigue constituyendo el sistema experimental mejor caracterizado para el estudio del desarrollo radicular en plantas.

1. FORMACIÓN DE RAÍCES LATERALES.

En plantas de *Arabidopsis thaliana* las raíces laterales se originan exclusivamente de las células del periciclo próximas al xilema (Dolan *et al.*, 1993). La formación de raíces laterales se inicia cuando una o un par de células del periciclo sufren varias rondas de divisiones anticlinales (Malamy and Benfey, 1997) para crear una sola capa celular de primordio (Fig. 1). La siguiente ronda de divisiones son divisiones periclinales formando 2 capas celulares, una interna y otra externa. Las siguientes rondas de división darán lugar a un primordio en forma de cúpula que eventualmente puede emerger de la raíz parental (Casimiro *et al.*, 2001; Dubrovsky *et al.*, 2001).

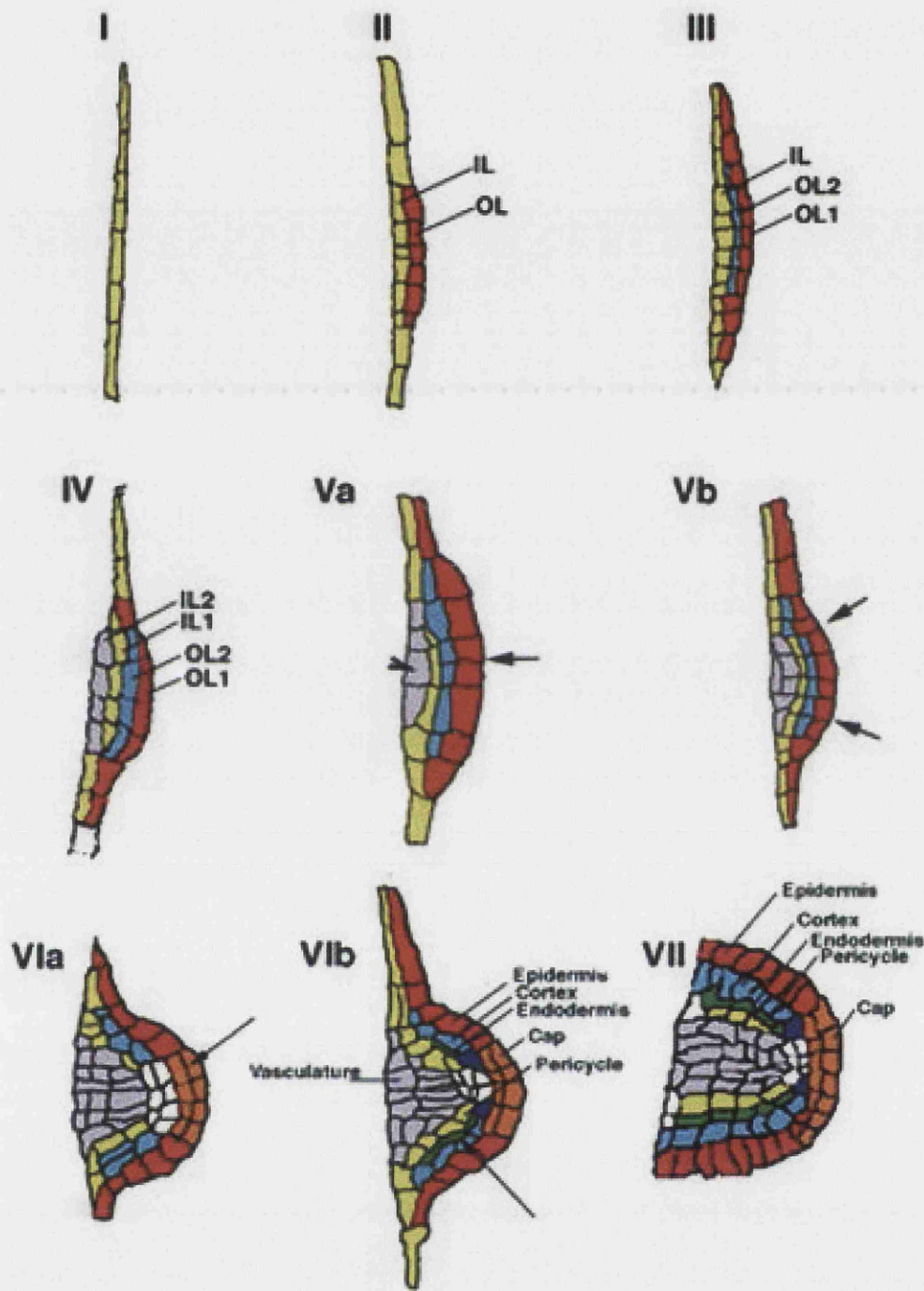


Figura 1. Modelo de desarrollo de primordio de raíces laterales en *Arabidopsis*. Los estadios se indican en cada diagrama. Los códigos de color indican la derivación putativa de cada tejido desde el estadio I al estadio VII basado en líneas marcadoras y estudios histológicos. Desde el estadio VI todos los elementos celulares radiales están presentes igual que en la raíz principal. Las células en blanco darán lugar al futuro centro quiescente. Adaptado de Malamy y Benfey 1997.

1.1.1 Eventos de preiniciación de formación RL. Activación de células del periciclo.

Aunque todas las células del periciclo pueden ser “competentes” para formar RL, sólo unas pocas adquieren el estatus de “células fundadoras” (CF) (Benkova *et al.*, 2010). Este hecho plantea dos cuestiones interesantes de cómo y cuándo tiene lugar el establecimiento de las células fundadoras y qué mecanismos determinan que algunas células del periciclo comiencen a tener identidad de CF frente a sus vecinas que no poseen esa capacidad. En trabajos recientes se ha propuesto que la zona de especificación/marcaje de las células fundadoras ocurre en una región llamada “meristemo basal”, comprendida entre el centro quiescente “QC” y la zona de transición (Fig. 2) (Dubrovsky *et al.*, 2006, De Rybel *et al.*, 2010). Como se demostró experimentalmente en *Arabidopsis* la ventana espaciotemporal del desarrollo de CF en la raíz tiene lugar en el meristemo basal y cubre una zona de 3-8 mm del extremo del meristemo principal, indicando que el primer punto de iniciación de raíces laterales ocurre aproximadamente 13-16 horas después de que las células del periciclo hayan salido de la zona de división celular del meristemo principal (Fig. 2).

Después de dejar el meristemo apical, las células del periciclo próximas al floema siguen en fase G1 del ciclo celular mientras que las células del periciclo próximas al xilema avanzan a fase G2 del ciclo celular (Beeckman *et al.*, 2001). Esta subpoblación de células del periciclo próximas al xilema pueden ser consideradas como un “meristemo extendido” (Casimiro *et al.*, 2003) ya que a diferencia de la células del floema o de las células de otros tejidos de la raíz estas células mantienen su capacidad de dividir después de salir del meristemo principal. La proteína nuclear ALF4 (Aberrant Lateral Root Formation 4) se requiere para mantener las células del periciclo en un estado de competencia mitótica ya que el mutante *alf4-1* posee células fundadoras que son incapaces de dividirse. Este mutante tiene bloqueada la inducción del marcador mitótico *CYCB1;1:GUS*, pero causa

sobreexpresión del marcador de ciclo celular temprano Ciclina dependiente de Kinasa B *CDKB:GUS* en este tejido (DiDonato *et al.*, 2004).

Estas células fundadoras son capaces de percibir y responder a una señal mitótica que reactiva su división celular. Hasta la fecha, los datos apuntan a que esta señal puede ser la acumulación puntual de auxina o un incremento de su señalización (De Smet *et al.*, 2007). Alterando la respuesta a auxina en estas células del periciclo (exceptuando las zonas del meristemo apical y basal) se bloquea la primera división de las células fundadoras (De Smet *et al.*, 2007). Sin embargo, el núcleo de estas células es capaz de migrar hacia la pared celular común lo que implica que esas células deben haber sido expuestas a una señal inductora de auxina.

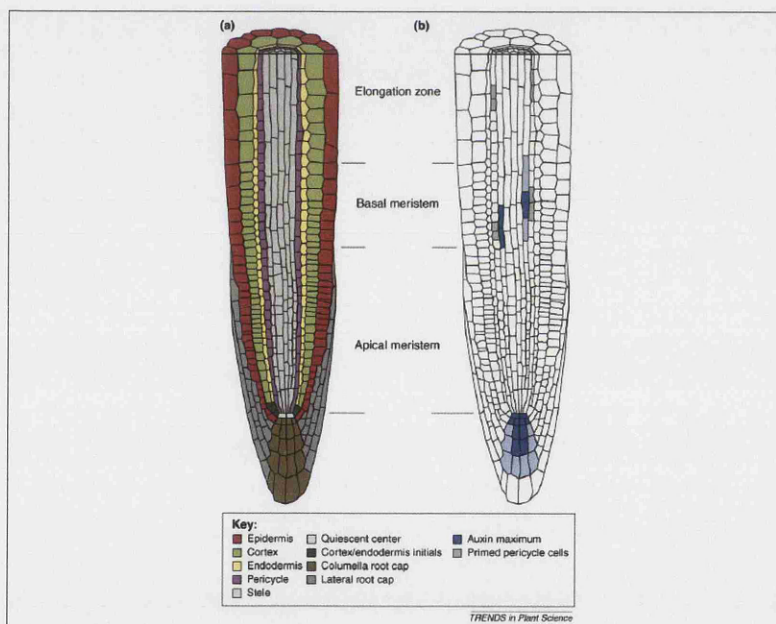


Figura 2. Representación esquemática de los diferentes tejidos de la raíz. Modificado de Peret *et al.*, 2009.

La señalización de auxina, unida a oscilaciones en los niveles de esta hormona, se ha considerado uno de los principales factores en el marcaje de las células fundadoras en el meristemo basal. Sin embargo, recientemente se ha propuesto que una oscilación de la expresión génica determina el espacio entre las futuras raíces laterales mediante la especificación de los sitios de preiniciación, y esta oscilación parece regularse por un mecanismo endógeno no dependiente de auxinas (Moreno-Risueño *et al.*, 2010). Estos autores han propuesto que la auxina a concentraciones dentro de los rangos

fisiológicos no es suficiente para la especificación de los sitios de preiniciación pero si es capaz de modular la localización de estos sitios. En este trabajo se describe un mecanismo de expresión génica que es cíclico y que se correlaciona con la expresión del marcador DR5:LUC. Dentro de los genes que se expresan de forma cíclica en el meristemo basal encontraron factores de transcripción pertenecientes a diversas familias. Es remarcable que muchos de estos FT no se habían relacionado anteriormente con la formación de las RL. Entre estos factores de transcripción (FT) destacan pertenecientes a la familia MADS-box como *SHATTERPROOF1* (*SHP1*), *SHATTERPROOF2* (*SHP2*), y *SEEDSTICK* (*STK*) para los que se había descrito su papel en desarrollo de carpelo, óvulo y semilla (Dinneny *et al.*, 2005), y *AGAMOUS-LIKE20* (*AGL20*) que regula la transición al estado reproductivo (Yant *et al.*, 2009). Además analizaron mutantes de inserción por T-ADN para otros 55 factores de transcripción que oscilaban en su expresión en el meristemo basal. Algunos de estos FT pertenecen a la familia de los ARFs como *ARF7* y *ARF2*, o a la familia de los NAC como *VND2*, *FEZ* y *SOMBRERO* (*SMB*) y encontraron que los mutantes de inserción para estos genes presentaban defectos en el marcaje de las células fundadoras y un menor número de raíces laterales.

Recientemente se han identificado nuevos genes implicados en el marcaje mediado por auxina de las células fundadoras del periciclo. Estos genes corresponden al llamado módulo *Aux/IAA28*, cuya función es dependiente de auxina (De Rybel *et al.*, 2010) (Fig. 3). En este trabajo observaron que el factor de transcripción *GATA23* se expresa específicamente en las células del periciclo próximas al xilema antes de la primera división asimétrica y que esta expresión se correlaciona con la oscilación del máximo de auxina en el meristemo basal. Estudios funcionales revelaron que *GATA23* controla la identidad de las células fundadoras del periciclo y que su expresión es dependiente de la ruta mediada por auxina y dependiente de la señalización mediada por *Aux/IAA28*.

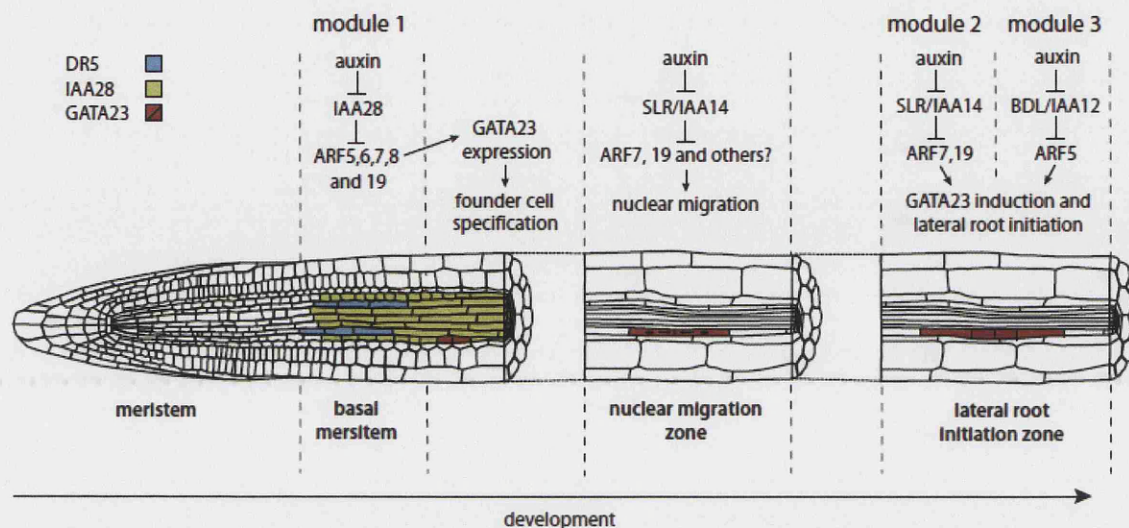


Figura 3. Representación esquemática de los módulos de señalización de auxina que actúan sucesivamente durante la especificación de las células fundadoras del periciclo en el meristemo basal (modulo 1) y migración nuclear e iniciación de formación de raíz lateral (módulo 2 y 3). Modificada de De Rybel *et al.*, 2010.

1.1.2 Regulación de la distribución de las células fundadoras del periciclo.

Como se ha comentado anteriormente, todas las células del periciclo próximas al xilema tienen la capacidad de dividir en respuesta a elevados niveles de auxina (Boerjan *et al.*, 1995; Dubrovsky *et al.*, 2008). Sin embargo, sólo un número limitado de células del periciclo próximas al xilema se marcan como células fundadoras en condiciones normales (Dubrovsky *et al.*, 2001). Curiosamente la iniciación en la formación de las RL ocurre a un ritmo regular durante el crecimiento de la raíz (Lucas *et al.*, 2008). Hasta hace poco, el mecanismo que regula el patrón regular de espaciamiento de RL a lo largo de la raíz principal ha permanecido desconocido. Sin embargo, en los últimos años gracias a diferentes estudios genéticos y genómicos se está comenzando a entender este proceso.

Se ha descrito que el marcaje de las células fundadoras está en correlación con la oscilación de la respuesta a auxina (visualizada con el promotor sintético de respuesta a auxina DR5) en células xilemáticas (De Smet *et al.*, 2007). Estos autores demostraron que las oscilaciones en la expresión del marcador *DR5:GUS* ocurrían a intervalos regulares de 15

horas y lo relacionaron con la especificación de CF en las células del periciclo adyacentes al protoxilema. Con este trabajo se concluyó que las raíces de *Arabidopsis* tienen un mecanismo oscilatorio dependiente de auxina y que es responsable de la periodicidad en la aparición de primordios de RL a lo largo de la raíz principal.

Además del control genético, el patrón espacial de las raíces laterales a lo largo de la raíz primaria de *Arabidopsis* puede estar influenciado por respuestas trópicas o estímulos mecánicos (Ditengou *et al.*, 2008). Por ejemplo, se ha descrito que estímulos gravitrópicos pueden inducir la formación de primordios en la zona externa de raíces dobladas manualmente (Lucas *et al.*, 2008). Se puede pensar de forma intuitiva que lo que ocurre es que se acumulan mayores niveles de auxina en la zona doblada de la raíz al ser estimulada por la gravedad (Ottenschlager *et al.*, 2003; Swarup *et al.*, 2005). Imágenes de microscopía confocal de plantas transgénicas que expresan el reportador DR5:venusYFP (Yellow Fluorescent Protein) revelaron cambios dinámicos de genes de respuesta a auxina consistentes con una redistribución de auxina entre tejidos (Ditengou *et al.*, 2008; Laskowski *et al.*, 2008). Se ha hipotetizado mediante una modelización *in silico* que este estímulo gravitrópico genera altos niveles de auxina en la parte exterior de la zona doblada de la raíz como consecuencia de cambios en los tamaños celulares. Los altos niveles de auxina promueven la expresión de transportador de influjo de auxina AUX1 (AUXIN RESISTANT 1) provocando un máximo en los niveles de auxina antes de la formación *de novo* del primordio de raíz lateral (Laskowski *et al.*, 2008). Por otro lado, se ha propuesto que la estimulación mecánica induce cambios en la expresión de genes de respuesta a auxina en el sitio de iniciación de RL requiriendo la relocalización del transportador de eflujo de auxina PIN1 (PIN-FORMED1) en las células adyacentes del protoxilema (Ditengou *et al.*, 2008). Sin embargo, se ha propuesto que la inducción mecánica de formación de RL no puede ser explicada ni por el mecanismo mediado por AUX1 ni por el mediado por PIN1. Así el mutante *pin1* no presenta ningún defecto en el desarrollo de RL (Benkova *et al.*, 2003) y en el caso del mutante *aux1* los

defectos que presenta en formación de RL pueden ser compensados mediante estimulación mecánica (Ditengou *et al.*, 2008). Esto sugiere que la señalización mediada por un estímulo mecánico debe existir independientemente del marcaje de las células fundadoras mediado por auxina. Por lo tanto, al menos dos mecanismos diferentes parecen estar operando en la raíz para influenciar el posicionamiento de los primordios de RL, una vía mediada por inducción mecánica y un mecanismo oscilatorio mediado por auxina. Esta hipótesis toma perfecto sentido para la raíz y su capacidad de responder tanto a señales ambientales como endógenas.

1.1.3 Regulación de la formación de las Raíces Laterales

Se han identificado y caracterizado recientemente muchos de los componentes de la transducción de señal que regula la formación de RL mediada por auxina (Fukaki *et al.*, 2007). Sin embargo, las bases moleculares de la señalización por inducción mecánica quedan aún por resolver. Una de las proteínas más importantes en la regulación de la iniciación de RL es el gen *IAA14/SLR1* (INDOLE ACETIC ACID 14)/SLR1 (SOLITARY ROOT 1) (Fukaki *et al.*, 2002). *IAA14/SLR1* pertenece a una familia de proteínas de vida corta denominadas Aux/IAA cuya función es la represión de la transcripción regulada por auxina (Fukaki *et al.*, 2002). Un paso importante en la ruta de iniciación de RL es la degradación dependiente de TIR1-Auxina de los factores Aux/IAA, como *IAA14/SLR1*. Mutaciones puntuales de aminoácidos en la secuencia de la proteína *IAA14* generan proteínas dominantes negativas que no se degradan a través de la ruta TIR1/Ubiquitina/Proteasoma 26S (Fukaki *et al.*, 2002). Así, el mutante *slr-1*, que es dominante negativo, no desarrolla raíces laterales ya que las células del periciclo no pueden realizar las primeras divisiones. Sin embargo, la pérdida de función del gen *IAA14/SLR1* (mutante *iaa14-1*) no presenta fenotipo (Okushima *et al.*, 2005) sugiriendo que otros miembros de la familia *Aux/IAA* pueden funcionar de forma redundante. Se ha visto que otros mutantes de la familia *Aux/IAA* de ganancia de función como

iaa1/axr5 (auxin resistant 5) (Yang *et al.*, 2004), *iaa3/shy2* (short hypocotyl 2) (Tian and Reed, 1999), *iaa18/crane* (Uehara *et al.*, 2008), *iaa19/msg2* (massugu2) (Tatematsu *et al.*, 2004) e *iaa28-1* (Rogg *et al.*, 2001) están implicados en desarrollo de raíces laterales (Tabla 1). Ninguno de estos mutantes tiene bloqueada completamente la iniciación de formación de RL sugiriendo la existencia de redundancia funcional entre los distintos miembros de la familia (Weijers *et al.*, 2005). Recientemente se ha mostrado la existencia de otro módulo de respuesta a auxinas, el de *BDL/IAA12-MP/ARF5*, que actuaría por debajo de IAA14 (De Smet *et al.*, 2010). En este trabajo se propuso la existencia de módulos discretos y sucesivos de respuesta a auxina que coordinan distintos procesos de desarrollo, probablemente a través de la regulación de dianas únicas, y que sería comparable a la respuesta bipartita de la auxina durante la especificación de la hipófisis (Weijers *et al.*, 2006). Así, se ha observado que una red genética con funciones diversas está regulada por una sola molécula como es la auxina (De Smet *et al.*, 2010) y que tanto los mecanismos de respuesta bimodular o multimodular pueden representar un principio general de regulación para la señalización de auxina en plantas.

En presencia de auxina, las proteínas de tipo F-box TIR1 (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1) o AFB1-3 (AUXIN RECEPTOR F-BOX PROTEIN 1-3) se unen a proteínas de tipo IAA (Dharmasiri *et al.*, 2005; Kepinski y Leyser., 2005) para promover su marcaje con ubiquitina y su posterior degradación por el proteasoma (Dharmasiri *et al.*, 2005; Gray *et al.*, 2003; Zenser *et al.*, 2001). Las proteínas TIR1/AFBs parecen tener una función redundante durante el desarrollo de las raíces laterales. Mientras que los mutantes simples *tir1* y *afb* presentan pequeñas diferencias en el número de PRL, el triple mutante *tir1afb2afb3* presenta una reducción del 90% (Dharmasiri *et al.*, 2005; Pérez-Torres *et al.*, 2008). Recientemente se ha descrito que la mutación *tir1* bloquea la inducción de RL promovida por la deficiencia de fosfato en el medio (Pérez-Torres *et al.*, 2008). La expresión de *TIR1* en el periciclo se induce al crecer las plantas en medio sin fosfato

mientras que plantas transgénicas que sobreexpresan TIR1 presentan el mismo fenotipo que plantas crecidas en medio sin fosfato. Los autores propusieron que la disponibilidad en el medio de fosfato modula el número de primordios de RL regulando la sensibilidad a auxina por una vía dependiente de *TIR1*. Este es un claro ejemplo de la conexión entre una hormona y la respuesta a un estímulo externo en el desarrollo del sistema radicular.

Los represores Aux/IAA dimerizan con factores de transcripción denominados de respuesta a auxina “Auxin Response Factors” (*ARF*) que controlan la transcripción génica dependiente de auxina (Guilfoyle and Hagen, 2007). Se ha demostrado que IAA14/SLR interacciona directamente con ARF7 y ARF19 (Fukaki *et al.*, 2005). El marcaje de IAA14/SLR para su degradación mediado por auxina y TIR1/AFB1-3 produce la derepresión de los factores de transcripción ARF7 y ARF19, cuya acción promueve la formación de las raíces laterales. El doble mutante *arf7arf19* presenta el mismo fenotipo que el mutante *slr1* en la disrupción de la formación de PRL (Fukaki *et al.*, 2002; Wilmoth *et al.*, 2005). Sin embargo, aunque en poco número, el doble mutante *arf7arf19* forma RL (Fukaki *et al.*, 2007), lo que ha sugerido que otros factores de transcripción de tipo ARFs podrían regular o contribuir en ausencia de ARF7/ARF19 en el proceso de formación de RL.

La familia de factores de transcripción ARF esta compuesta por 23 miembros (Guilfoyle and Hagen, 2007). Se ha demostrado que 5 de ellos tienen función como activadores transcripcionales (ARF4, 5, 6, 7 y 19) y el resto de miembros parecen tener un papel represor (Tiwari *et al.*, 2003; Tiwari *et al.*, 2004). Algunos ARFs parecen regular también el desarrollo de raíces laterales (Mallory *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005; Tian *et al.*, 2004), aunque serán necesarios estudios futuros para determinar el papel de estas proteínas.

Proceso molecular/celular	Mutante	Estadio desarrollo	Fenotipo raíz lateral	Referencias
Homeostasis auxina	<i>sur1</i>	I	> número de RL	Seo <i>et al.</i> , (1998)
	<i>sur2</i>	I	> número de RL	Barlier <i>et al.</i> , (2000)
	<i>ilr2</i>	I	< número de RL	Magidin <i>et al.</i> , (2003)
	<i>arf8</i>	I	> número de RL	Tian <i>et al.</i> , (2004)
	<i>ilr1 iar3 ill2 ydk1</i>	I	< número de RL	Rampey <i>et al.</i> , (2004)
	<i>df11</i>	I	< número de RL	Takase <i>et al.</i> , (2004)
	<i>df11</i>	I	< número de RL	Nakazawa <i>et al.</i> , (2001)
Señalización de auxina	<i>tir1 afb1</i>	I	< número de RL	Dharmasiri <i>et al.</i> , (2005)
	<i>axr1</i>	I	< número de RL	Lincoln <i>et al.</i> , (1990)
	<i>axr6/cul1</i>	I	< número de RL	Hobbie <i>et al.</i> , (2000)
	<i>iaa1/axr5</i>	I	< número de RL en auxina	Yang <i>et al.</i> , (2004)
	<i>iaa3/shy2-2</i>	I y emergencia	< número de RL	Tian <i>et al.</i> , (1999)
	<i>iaa14/slr</i>	I y emergencia	No RL	Fukaki <i>et al.</i> , (2002)
	<i>iaa18/crane</i>	I	< número de RL	Uehara <i>et al.</i> , (2008)
	<i>iaa19/msg 2</i>	I	< número de RL	Tatematsu <i>et al.</i> , (2004)
	<i>iaa28</i>	I	RL muy reducidas o nulas	Rogó <i>et al.</i> , (2001)
	<i>arf7 arf19 mir160-resistant</i>	I y emergencia	No RL	Okushima <i>et al.</i> , (2005)
	<i>ARF10/16/17</i>	I	< número de RL	Mallory <i>et al.</i> , (2005) Wang <i>et al.</i> , (2005)
Transporte de auxina	<i>aux1</i>	I	< número de RL	Bennett <i>et al.</i> , (1996)
	<i>lax3</i>	Emergencia	< número de RL	Swarup <i>et al.</i> , (2008)
	<i>pin1/3/4/7</i>	I y emergencia	< número de RL	Benkova <i>et al.</i> , (2003)
	<i>pgp4</i>	I	> número de RL	Santelia <i>et al.</i> , (2005)
Transporte de	<i>gnom</i>	I	< número	Geldner <i>et al.</i> ,

auxina y regulación	<i>axr4</i>	I	de RL	(2004)
			< número de RL	Hobbie (2006)
	<i>pinoid</i>	I	< número de RL	Robert <i>et al.</i> , (2008)
	<i>big/tir3/doc1</i>	I	< número de RL	Desgagne <i>et al.</i> , (2005)
Ciclo celular	<i>35S::KRP2</i>	I	< número de RL	Himanen <i>et al.</i> , (2002)
	<i>alf4</i>	I	No RL	DiDonato <i>et al.</i> , (2004)
Comunicación celular	<i>acr4</i>	I	> número de	De Smet <i>et al.</i> , (2008)
	<i>crr1/2/3/4</i>		primordios	
Remodelación de cromatina	<i>pickle</i>	I	> número de primordios en	Fukaki <i>et al.</i> , (2006)
			auxina	
Ruta citoquininas	<i>brx-2</i>	I	> número de RL en citoquinina	Li <i>et al.</i> , (2009)
Proteínas F-box	<i>35S::SINA T5</i>	I	< número de RL	Xie <i>et al.</i> , (2002)
	<i>cegenduo</i>	I	> número de RL	Dong <i>et al.</i> , (2006)
	<i>xbat32</i>	I	< número de RL	Nodzon <i>et al.</i> , (2004)
	<i>arabidillo 1/2</i>	I	< número de RL	Coates <i>et al.</i> , (2006)

Tabla 1. Información general de mutantes con defectos en formación de RL e implicados en procesos moleculares o celulares conocidos durante la formación de raíces laterales

1.1.4 Desarrollo de los primordios de raíces laterales.

Morfológicamente, la iniciación de las RL se detecta por primera vez cuando entre 1 y 3 parejas de células del periciclo comienzan varias rondas de divisiones anticlinales. Normalmente, esas divisiones son asimétricas, dando lugar a la formación de dos células hijas unas pequeñas, en el centro y otras más alargadas (Fig. 4). Aunque son 3 las capas celulares del periciclo que dividen durante la formación del primordio experimentos de linaje celular han mostrado que solo la fila central contribuye significativamente al establecimiento del primordio (Kurup *et al.*, 2005). La división asimétrica es indicativa normalmente de que las células hijas tienen distintos destinos celulares (Scheres y Benfey, 1999). Acorde con esta conclusión se ha demostrado que las células hijas pequeñas (no las alargadas) expresan genes relacionados con división asimétrica (De Smet *et al.*, 2008).

Se ha intentado identificar genes que regulen esas divisiones anticlinales por análisis transcriptómicos de los mutantes *slr* y *arf7arf19* que tienen alterada la iniciación de la formación de RL (Fukaki *et al.*, 2002 ; Vanneste *et al.*, 2005). En estos análisis, se observó que la mutación *slr-1* afecta a la expresión, entre otros, de algunos genes implicados en la regulación del ciclo celular (Vanneste *et al.*, 2005). La sobreexpresión del regulador de ciclo celular *CycD3;1*, (que promueve la transición de fase G1 a S del ciclo celular) en el mutante *slr-1* induce algunas rondas de divisiones anticlinales pero es incapaz de activar la expresión de marcadores como *ACR4* (ARABIDOPSIS CRINKLY 4) (De Smet *et al.*, 2008) o permitir la formación de un primordio completo (Vanneste *et al.*, 2005). Así pues, la activación del ciclo celular no es suficiente para inducir el desarrollo de primordios en el mutante *slr-1*. Además se ha publicado que la proteína GNOM juega un papel importante en la división celular asimétrica (Steinmann *et al.*, 1999; Geldner *et al.*, 2004). Mutantes con niveles bajos de esta proteína tienen afectada la formación de raíces laterales. Análisis microscópicos revelaron que los defectos no son en arresto de primordios en

estadios tempranos de desarrollo sino en una incapacidad de iniciar la formación del primordio (Geldner *et al.*, 2004).

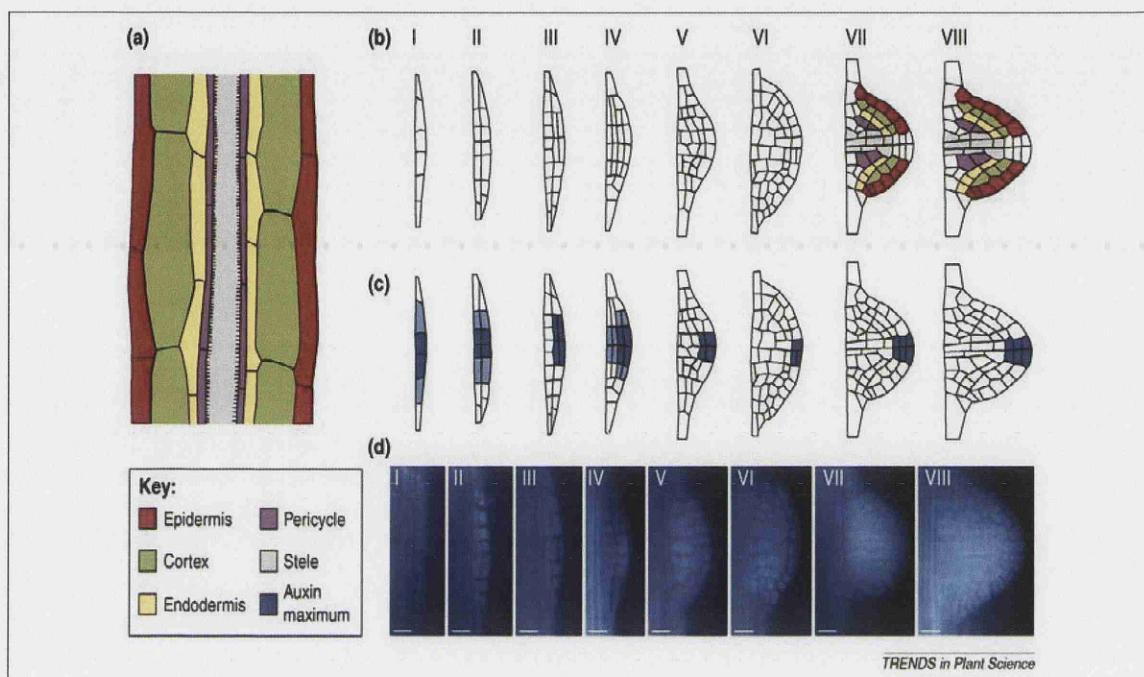


Figura 4. Cambios morfológicos durante el desarrollo de primordios de raíces laterales. A) Las raíces laterales se originan dentro de la raíz primaria en las células del periciclo. B) Establecimiento del gradiente máximo de auxina utilizando el reportador DR5:GUS. D) Los dibujos se hicieron a partir de las fotos reales. Barra de escala 20 μm. (Modificado Peret *et al.*, 2009).

El gen *GNOM* codifica para un ARF-GEF (ADP RIBOSYLATION FACTOR-GUANIDINE EXCHANGE FACTOR) que regula el tráfico de los transportadores del eflujo de auxina PIN (Steinmann *et al.*, 1999). Mutantes de pérdida de función para los genes *PIN* (como *pin1*, 3, 4 y 7) tienen el mismo fenotipo que el inducido por la auxina en los mutantes *gnom* (Friml *et al.*, 2003). Esto se debe a que tanto los transportadores PIN como las proteínas GNOM son necesarios para el establecimiento del gradiente de auxina requerido durante la formación del primordio, con un máximo inicial en las células centrales que más tarde será en las células del extremo de PRL (Fig. 4). Este máximo de auxina marca el patrón de formación del nuevo primordio de la misma forma que un morfógeno durante el desarrollo animal (Bhalerao y Bennett 2003). Sin embargo, no se han identificado aún los genes reguladores implicados, como factores de transcripción, que se

expresan en un determinado umbral a lo largo del gradiente de auxina en el PRL.

La auxina, que inicialmente se acumula en las células centrales del PRL, pasa más tarde a las células del extremo del primordio donde intervendrá en la degradación de las proteínas Aux/IAA permitiendo la actuación de los factores ARF para la transcripción de genes implicados en el desarrollo del primordio. Recientemente, se ha visto que dos genes regulados por *ARF7/ARF19*, *LBD16/ASL18* (*LATERAL ORGAN BOUNDARIES-DOMAIN 16/ASYMMETRIC LEAVES2-LIKE18*) y *LBD29/ASL16* son capaces de revertir el fenotipo cuando se sobreexpresan en el fondo del doble mutante *arf7arf19* (Okushima *et al.*, 2007). *LBD16/ASL18* y *LBD29/ASL16* pertenecen a una gran familia de factores de transcripción específicos de plantas y se ha demostrado que son dianas directas de ARF7 y ARF19. Así estas proteínas LBD parecen actuar aguas abajo de los factores ARF7 y ARF19 participando en la formación del primordio mediada por auxina. La identificación de genes que son regulados por LBD16 y LBD29 permitirá comprender el control de las divisiones de las células fundadoras y la correcta formación del primordio.

En *Arabidopsis*, *MYB77*, uno de los factores de transcripción de tipo R2R3 MYB está implicado en la respuesta a auxina (Shin *et al.*, 2007). Una mutación nula del gen *MYB77* reduce en gran medida la expresión de genes inducibles por auxina mientras que la sobreexpresión de *MYB77* activa genes inducibles por auxina en ausencia de esta hormona. El mutante *myb77* tiene reducida la densidad de RL a bajas concentraciones de IAA. De hecho, el doble mutante *myb77/arf7* desarrolla menos RL, indicando una relación sinérgica entre ambos genes. El dominio de activación del factor de transcripción MYBB77 interacciona con la región C-terminal (dominios III y IV) de la proteína ARF7 y la coexpresión de MYB77 y la región C-terminal de ARF7 aumenta la expresión de genes de respuesta a auxina en protoplastos. Estos resultados sugieren que la interacción entre MYB77 y

ARFs, incluyendo ARF7, juega un papel clave en el crecimiento y en procesos mediados por auxina como por ejemplo la formación de RL. Este trabajo sugiere que MYB77, o MYBs relacionados, interaccionan con los factores ARFs regulando una gran variedad de procesos de desarrollo y crecimiento mediado por auxina.

Por otro lado, se ha visto una desviación en la división de las células del primordio en el mutante para el gen *PUCHI*, un factor de transcripción del tipo *AP2 (APETALA 2)/EREBP (ETHYLENE RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN)* (Hirota *et al.*, 2007). Mutaciones recesivas para el gen *PUCHI* generan alteraciones en la división de los primordios y provocan que las células adyacentes al primordio se hinchen. La expresión de *PUCHI* se detecta por primera vez en todas las células de primordios de RL en estadios tempranos para detectarse más tarde sólo en la región próxima al primordio. La expresión de *PUCHI* requiere los elementos de respuesta a auxina en su región promotora y la aplicación de auxina exógena produce una acumulación de los niveles del ARNm. Estos resultados sugirieron que *PUCHI* actúa aguas abajo de la señalización de auxina y que contribuye a la morfogénesis del primordio controlando los patrones de división durante los estadios tempranos de formación del primordio (Hirota *et al.*, 2007). Será importante determinar en el futuro qué tipo de genes son regulados por *PUCHI* durante el desarrollo del primordio para entender el papel de este gen en la formación y desarrollo de los primordios.

Recientemente se han identificado mediante análisis transcriptómicos de las células del periciclo próximas al xilema más de una docena de genes potencialmente implicados en la regulación de la división celular asimétrica y de la especificación celular durante la iniciación de la formación de RL (De Smet *et al.*, 2008). Uno de esos candidatos, *ACR4*, se expresa en las células hijas pequeñas que se forman después de la primera división asimétrica en las células del periciclo. Mutantes para el gen *ACR4* y miembros de la

misma familia CRR4 (CRINKLY4RELATED 4) forman PRL que no expresan o lo hacen de forma aberrante genes como *LBD5*:GUS o el promotor sintético de respuesta a auxina DR5:GUS. *ACR4* parece estar influenciando la especificación del destino celular durante el desarrollo del primordio. El gen *ACR4* codifica para un receptor tipo kinasa asociado a membrana que probablemente regule la formación del primordio a través del reconocimiento de una molécula señalizadora como podría ser un péptido. Se han encontrado defectos en el desarrollo de primordios en mutantes de miembros de la familia de ACR4 que hacen que los PRL se inicien unos junto a otros o en el polo opuesto donde normalmente no se formarían. La función de *ACR4*, así como de los genes relacionados, es necesaria para la represión de las divisiones de las células adyacentes al primordio. Por lo tanto, ACR4 y genes homólogos forman parte de un mecanismo de desarrollo que parece estar implicado en la represión de las divisiones proliferativas de las células adyacentes del periciclo. Dado que *ACR4* se expresa exclusivamente en el primordio, este tipo de receptores parecen ejercer su regulación como una señal celular no autónoma que reprime la división de las células del periciclo que rodean al primordio.

Recientemente se ha publicado que el gen *SHORTROOT* es un regulador clave de la formación del sistema radicular controlando no solo la formación del meristemo de la raíz principal sino también la iniciación del desarrollo de raíces laterales, su patrón de distribución y la formación de raíces adventicias (Lucas *et al.*, 2011). Además se observó que la implicación del gen *SHR* durante la iniciación y formación del primordio es diferente del papel que juega durante el desarrollo del meristemo de la raíz principal.

1.1.5 Emergencia del primordio de RL

Los tejidos del cortex y la endodermis forman círculos concéntricos alrededor de las células del periciclo en las cuales se ha iniciado el desarrollo del primordio (Fig. 5) por lo que la emergencia del PRL implica que debe

pasar a través de estos tejidos en la raíz principal. En *Arabidopsis*, esto comprende capas celulares como la endodermis, células del cortex y epidermis. En otras especies de plantas, como arroz, el PRL debe atravesar hasta 15 capas de células (Osmont *et al.*, 2007). Algunos investigadores han especulado durante más de un siglo que el desarrollo del primordio y la separación celular de los tejidos adyacentes de la raíz tiene que estar altamente coordinada para minimizar el daño y reducir los riesgos de lesiones o infecciones (Lloret, 2002).

En plantas jóvenes, de 4 días post-germinación la auxina se sintetiza principalmente en la parte aérea y se transporta a la raíz mediante 2 rutas de igual importancia: el transporte mediado por el floema y el transporte polar. En plantas de 8 días el transporte mediado por el floema empieza a ser el transporte dominante (Ljung *et al.*, 2005). Este suministro de auxina aéreo a la raíz es necesario para promover la emergencia del primordio (Bhalerao *et al.*, 2002). Además se ha visto que plantas a las que se les ha eliminado los cotiledones y las hojas tienen bloqueada la emergencia de RL (Swarup *et al.*, 2008). Las raíces también tienen su fuente propia de auxina, sin embargo las RL sólo adquieren la capacidad de sintetizarla después de la emergencia del primordio (Peret *et al.*, 2009). Por lo tanto, es poco probable que esta fuente de auxina juegue un papel importante en la emergencia del primordio.

La iniciación de la formación de RL está regulada por la auxina que se produce en el meristemo de la raíz principal (Casimiro *et al.*, 2001; De Smet *et al.*, 2007) mientras que la emergencia depende exclusivamente de la auxina procedente de la parte aérea (Bhalerao *et al.*, 2002). La auxina modifica el destino celular y activa la división celular durante la iniciación de la formación del primordio mientras que durante la emergencia se encuentra ligada a la separación celular (Boerjan *et al.*, 1995; Laskowski *et al.*, 2006). Patrones de expresión génica de raíces tratadas con auxina mostraron altos niveles de expresión génica de genes que codifican para

enzimas remodeladoras de la pared celular como *pectatoliasa*, *pectil metilesterasa*, *expansinas* y *b-xilosidasa* (Laskowski *et al.*, 2006). Sin embargo, la inducción mediada por auxina de un grupo de genes implicados en separación celular plantea la cuestión de si el primordio produce sus propias enzimas o si son producidas por los tejidos adyacentes. Se ha demostrado recientemente que algunos genes potencialmente implicados en remodelación de pared celular se expresan en frente del primordio en desarrollo, incluyendo genes que codifican para *poligalacturonasas* (Gonzalez-Carranza *et al.*, 2007; Ogawa *et al.*, 2009), *proteasas tipo subtilisinas* (Neuteboom *et al.*, 1999), *xiloglucan endotransglucosilasa/hidrolasa* y *pectatoliasas* (Swarup *et al.*, 2008). Sin embargo, la expresión de enzimas remodeladoras de pared celular en los sitios de emergencia del primordio no afecta a la integridad del mismo. Esto podría explicarse por una diferencia en la composición de la pared celular del primordio y la raíz parental. La pectina en el primordio en desarrollo está altamente metilada mientras que en las células que lo rodean procedentes de la raíz principal están altamente demetiladas por la acción de las pectin-metil-esterasas (Laskowski *et al.*, 2006). Esto hace que las enzimas remodeladoras de pared celular sólo tengan actividad en los tejidos externos del primordio.

Se ha descrito recientemente que la auxina que se origina en el primordio en desarrollo actúa como una señal inductiva que reprograma las células adyacentes provocando la separación de sus paredes celulares (Swarup *et al.*, 2008). LAX3 (LIKE AUX1 3) regula la expresión de varias enzimas remodeladoras de pared celular (CWR). Esto incluye a *pectatoliasa* (PLA2); *poligalacturonasa* (PG); *Xiloglucanxiloglucosiltransferasa* (XTR6); *expansina* (EXP17); y *glicosilhidrolasa* (GLH17) (Henrissat 1991; Cosgrove 2000; Marín-Rodríguez *et al.*, 2002; Vissenberg *et al.*, 2005; Wen *et al.*, 2006). Las enzimas PG y PLA2 son particularmente importantes para la separación celular durante la emergencia de las RL ya que rompen la pectina demetilada que es un sustrato en el que están enriquecidas las

células que rodean al primordio. Curiosamente la proteína IAA3/SHY2 que se expresa en la endodermis regula un grupo de enzimas CWR que se superponen con las reguladas por *LAX3*. Esto refleja las diferencias en la composición de la pared celular entre los tejidos de la raíz endodérmica y lateral. El patrón de expresión de *LAX3* se limita a los tejidos exteriores de la raíz y es importante para la inducción localizada de genes CWR como *PG* y *XTR6*. Esto permite asegurar una inducción estricta controlada por auxina de los componentes de la maquinaria de separación celular y no comprometer así la integridad de la raíz principal. Se sabe que altos niveles de auxina producen separación celular en las raíces de *Arabidopsis* (Boerjan *et al.*, 1995; Laskowski *et al.*, 1995). Sin embargo, los autores de estos estudios observaron que la separación celular se producía de forma anormal mientras que en condiciones naturales la separación celular es muy localizada.

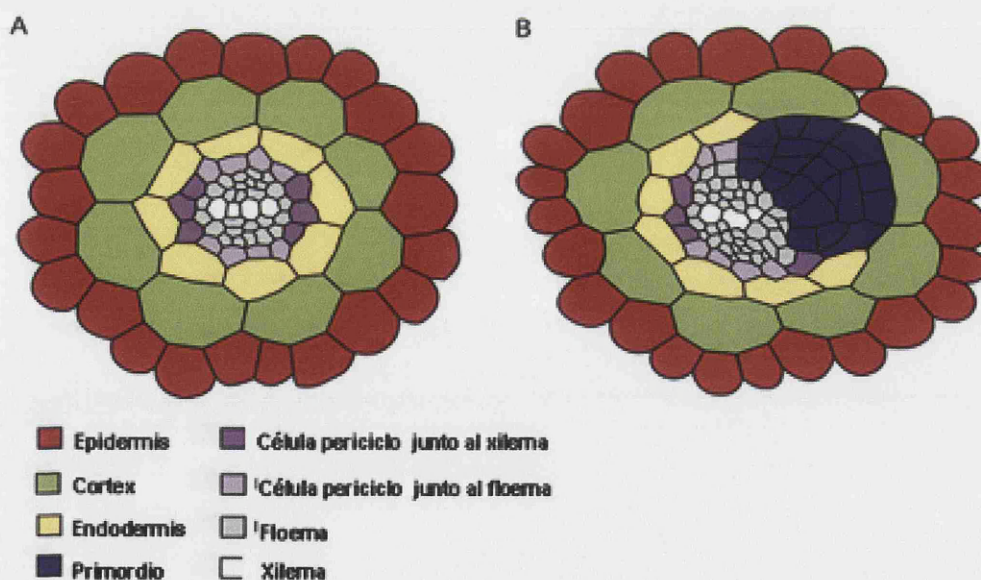


Figura 5. Sección transversal de raíz de *Arabidopsis* con un primordio emergiendo. A) La raíz de *Arabidopsis* tiene una estructura simple compuesta por las células de los haces vasculares rodeadas por tres capas celulares. B) La emergencia del primordio provoca la reprogramación de las células externas para promover la separación celular. (Adaptado de Peret *et al.*, 2009)

El mutante *lax3*, que tiene afectada la emergencia de raíces laterales, presenta un incremento significativo del número de PRL en comparación con el silvestre (Swarup *et al.*, 2008). El retraso en la progresión de desarrollo de RL en el mutante *lax3* es causado probablemente por la auxina

procedente de las hojas (que promueve la emergencia de las RL) (Bhalerao *et al.*, 2002) que se acumula a niveles por encima de los óptimos en el periciclo de la raíz estimulando la iniciación ectópica de nuevos primordios. Esta hipótesis está apoyada por los resultados obtenidos por Lucas *et al.*, (2008) que revelaron una regulación por retroalimentación entre la iniciación y la emergencia en el desarrollo del primordio.

Se puede concluir que la emergencia de las raíces laterales es un proceso altamente regulado en el que se emplea una señal común para sincronizar el proceso de iniciación de desarrollo de raíces laterales y la emergencia. Además la regulación de la emergencia de las RL en plantas es de gran importancia para la integridad del sistema radicular completo ya que los sitios de emergencia se suelen usar por patógenos del suelo como puntos de entrada e infección (Sprague *et al.*, 2007). Esta presión selectiva debe haber influenciado en una correcta y compleja regulación del proceso. Además, para reducir infecciones, el proceso de formación de raíces laterales parece estar ligado con la producción de moléculas de defensa así como la activación de genes de defensa en los sitios de emergencia (Park *et al.*, 2004).

1.1.6 Activación del meristemo de la raíz lateral y elongación

En el momento en que la raíz lateral atraviesa la epidermis se piensa que tiene lugar la activación del meristemo. Como se comentó anteriormente, los meristemos de RL tienen la capacidad de producir auxina (Ljung *et al.*, 2005) pero no se sabe en que estadio de formación de primordio se adquiere la independencia en el suministro de auxina de la raíz principal. El arresto en el estadio de postemergencia en el mutante *alf3* se puede reestablecer aplicando auxina exógena o precursores de indol (Celenza *et al.*, 1995). Este resultado sugiere que *ALF3* es necesario para mantener la capacidad proliferativa del meristemo secundario durante su desarrollo.

Por lo tanto es posible que la capacidad de sintetizar su propia auxina pudiera coincidir con el momento de activación del meristemo. Sin embargo parece ser necesario el transporte acropétalo de la parte aérea o de la raíz principal para el desarrollo continuo y la elongación de la raíz lateral. Alteraciones en el transporte acropétalo de auxina en el mutante *mdr1* (*multiple drug resistance 1*) produce una reducción en la elongación y el arresto prematuro de las raíces laterales (Wu *et al.*, 2007).

1.1.7 Otras hormonas implicadas en la formación de RL

1.1.7.1 Citoquininas

Las citoquininas (CK) juegan generalmente un papel antagonista a las auxinas, tanto en el desarrollo de la planta como en la dominancia apical de la parte aérea y regeneración de tejidos. Estudios recientes han indicado que la citoquinina es un regulador negativo de la formación de las RL. Por ejemplo, múltiples mutaciones en componentes de la señalización de citoquininas en *Arabidopsis* como los Reguladores de Respuesta de *Arabidopsis* tipo B, “Type B ARRs” y los receptores de citoquinina AHK (*Arabidopsis* Histidina Kinase) muestran un incremento en el número de RL (Mason *et al.*, 2005; Riefler *et al.*, 2006). Además, plantas transgénicas que tienen niveles reducidos de citoquininas endógenas, porque sobreexpresan la enzima que degrada citoquininas “Cytokinin oxidase” (CKX), presentan mayor número de RL (Werner *et al.*, 2001, 2003; Lohar *et al.*, 2004). Por el contrario, múltiples mutaciones en ARRs de tipo A, que son reguladores negativos de la señalización de CK presentan menor número de RL (To *et al.*, 2004). Estas observaciones sugieren que las citoquininas endógenas están implicadas en la inhibición de la formación de las RL. De hecho, el crecimiento de plantas en medio con CK inhibe la iniciación de la formación de RL en *Arabidopsis* (Li *et al.*, 2006; Laplaze *et al.*, 2007; Kuderova *et al.*, 2008) y arroz (Rani Debi *et al.*, 2005). En el trabajo de Li *et al.*, (2006) se demostró que el tratamiento con CK inhibe la iniciación de la formación de

RL bloqueando el paso de fases G2 a M del ciclo celular en las células fundadoras del periciclo.

La represión de la iniciación de formación de RL es dependiente de los componentes de la señalización de CK incluyendo al receptor de CK CRE1/AHK4 y los AHPs (Arabidopsis Histidina Phosphotransfer proteins) (Hutchison *et al.*, 2006). Es interesante resaltar que la aplicación de auxina exógena no rescata la inhibición producida por la CK, aunque puede rescatar las primeras divisiones celulares. Estos resultados indican que la acumulación de CK en las células del periciclo no influye en la activación de las divisiones celulares de las células del periciclo mediadas por auxina pero sí que bloquea el programa de desarrollo del primordio de RL. El conocimiento de los tejidos responsables de la respuesta de las CK podría ayudar a comprender mejor la interacción de la regulación hormonal en la formación de RL. Estudios en los que se han utilizado plantas transgénicas de *Arabidopsis* que expresaban la enzima de biosíntesis de CK de *Agrobacterium tumefaciens*, *isopentenil transferasa* (IPT) en las células del periciclo del protoxilema, han visto que se inhibe la iniciación de RL (Laplaze *et al.*, 2007), mientras que la expresión en las células del periciclo del protoxilema de la enzima encargada de la degradación de citoquininas, Citoquinina Oxidasa 1 (CKX1) produce la derepresión de la iniciación de RL. Estos experimentos proporcionan evidencias suficientes de que las CK endógenas en las células del periciclo del protoxilema inhiben la iniciación de RL. En el trabajo de Laplace *et al.*, (2007) también se demostró que la CK exógena inhibe la inducción mediada por auxina de la expresión de los genes PIN, lo que interfiere en el establecimiento del gradiente de auxina durante la iniciación de formación del primordio. Estos datos indican que probablemente la CK endógena esté impidiendo la acumulación dependiente de auxina de los transportadores PIN e inhibiendo así la división asimétrica necesaria para la formación del primordio. De forma similar la sobreproducción de CK por la sobreexpresión de la enzima IPT interfiere con el desarrollo inicial del primordio y la respuesta máxima a auxina durante el desarrollo del primordio (Kudero *et al.*, 2008). Por otro lado, la auxina

exógena inhibe rápidamente la síntesis de CK en plantas de *Arabidopsis* indicando que la CK (Nordstrom *et al.*, 2004). Al igual que en *Arabidopsis* en la leguminosa *Medicago truncatula* la señalización de CK tiene también un papel en la inhibición de la formación de RL. La reducción de los niveles del receptor de CK en *Medicago* produce raíces que son insensibles a CK y desarrollen un elevado número de RL (Gonzalez-Rizzo *et al.*, 2006), lo que indica un papel común de las CK en la formación de RL en plantas superiores.

1.1.7.2 Acido Abcísico

La implicación del ácido abscísico (ABA) en la formación de RL se demostró inicialmente por el estudio de mutantes de señalización de ABA en *Arabidopsis*. En estos estudios se ha demostrado que la hormona ABA es un regulador negativo de la emergencia de RL (Smet *et al.*, 2006). La aplicación de ABA de forma exógena inhibe la emergencia del primordio de la raíz principal además de la activación del meristemo de la raíz lateral. Ésta inhibición no se puede revertir aplicando auxina exógena indicando la existencia de un punto de control independiente de auxina y sensible a ABA que está implicado en el estadio de postemergencia del primordio (De Smet *et al.*, 2003). También hay evidencias genéticas de la interacción de las hormonas ABA y auxina en la formación de RL. El gen *ABI3* (*ABA Insensitive 3*) codifica para un factor de transcripción de tipo B3 necesario para la señalización de ABA que se induce por auxina en el primordio (Brady *et al.*, 2003). Mutaciones en el gen *ABI3* atenúan la capacidad de respuesta de formación de RL tras la aplicación de auxina exógena. Por el contrario mutaciones en el gen *ERA1* (*Enhanced Response to ABA 1*) que codifica para una farnesil transferasa producen un incremento en el número de raíces laterales. Por lo tanto, mientras que el ABA exógeno regula negativamente la emergencia de primordios de RL la señalización de ABA mediada por *ERA1* y *ABI3* es necesaria para la formación de RL mediada por auxina, concretamente para la iniciación de la formación del primordio

indicando una relación cruzada entre la señalización por ABA y la acción de la auxina.

Se ha visto además que el ABA está implicado en la formación de RL mediada por nutrientes. Altas concentraciones de NO₃ inhiben el desarrollo de RL inmediatamente después de la emergencia del primordio de la raíz principal (Signora *et al.*, 2001). Los efectos inhibitorios del NO₃ se reducen significativamente en algunos mutantes insensibles a ABA (*abi4* y *abi5*), mutantes para la biosíntesis de ABA (*aba1*, *aba2* y *aba3*) pero no en otros mutantes insensibles a ABA como *abi1*, *abi2* y *abi3*. Esto indica que el efecto inhibitorio de NO₃ en el desarrollo de RL implica rutas de transducción de señal específicas de ABA. El mutante relacionado con auxina *ibr5* (*indole-3-butyric acid response 5*) proporciona evidencias de una comunicación cruzada entre la señalización del ABA y la auxina. El mutante *ibr5* tiene reducida tanto la formación de RL inducida por IBA como la inhibición de la germinación inducida por ABA (Monroe-Augustus *et al.*, 2003; Strader *et al.*, 2008). El gen *IBR5* que codifica para una proteína fosfatasa que promueve la respuesta a auxina a través de un mecanismo distinto de TIR1 y los represores Aux/IAA. Por otro lado el mutante de ganancia de función para el gen *AXR2/IAA7* es resistente a la aplicación de ABA exógeno mientras que el mutante *slr1/iaa14* es hipersensible a la acción del ABA (Wilson *et al.*, 1990; Fukaki *et al.*, 2002) sugiriendo que la señalización de auxina dependiente de Aux/IAA afecta también a la actividad del ABA en la raíz.

1.1.7.3 Brasinoesteroides

Se ha visto que hay una regulación cruzada de rutas dependientes de brasinoesteroides (BR) con rutas dependientes de auxina en varios procesos de desarrollo y en la regulación de la transcripción (Nakamura *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2005; Nakamura *et al.*, 2006; Nakamoto *et al.*, 2006). En el trabajo de Bao *et al.*, (2004) se demostró que la auxina y los brasinoesteroides promueven la formación de raíces laterales de forma sinérgica. El mutante

de *Arabidopsis*, *bri1* (*brassinosteroid-insensitive 1*) que es insensible a brasinoesteroides por un defecto en el receptor de BR, tiene menos raíces laterales que plantas silvestres. Además la mutación *bri1* reduce la expresión del promotor sintético de respuesta a auxina DR5:GUS en el ápice de la raíz mientras que la aplicación de brasinoesteroides de forma exógena promueve la expresión de DR5:GUS en al ápice de plantas silvestres. También se ha visto que los brasinoesteroides promueven el transporte acropétalo de auxina en la raíz, lo que hace pensar que el efecto de aumentar el número de raíces laterales con tratamientos con BR se debe al aumento de transporte acropétalo de auxina. Se ha visto que el papel de los BR en la formación de RL en guisante es igual que en *Arabidopsis* (Ferguson *et al.*, 2005) indicando que la interacción auxina-BR se encuentra conservada entre plantas dicotiledóneas.

1.1.7.4 Giberelinas

El papel de las giberelinas (GA) en la formación de RL no se ha estudiado en detalle pero hay algunas evidencias que implican a estas hormonas en el proceso. Por ejemplo, un mutante de guisante deficiente en GA tiene menos nódulos con fijación de nitrógeno y raíces laterales (Ferguson *et al.*, 2005) sugiriendo que las GA favorecen tanto la nodulación como la formación de raíces laterales en guisante. Se ha visto que mutantes de *Arabidopsis* deficientes en GA tienen un crecimiento de raíz principal reducido (Fu and Harberd, 2003), pero la implicación en el desarrollo de RL no se ha publicado hasta la fecha.

1.1.7.5 Etileno

El etileno produce la estimulación de la formación de raíces adventicias en muchas especies vegetales (Clark *et al.*, 1999), pero el efecto en el desarrollo de RL se ha empezado a analizar recientemente. En el trabajo de Negi *et al.*, (2008) se observó que el etileno regula de forma

negativa la formación de RL alterando el transporte de auxina. Estos autores observaron que el incremento en la síntesis de etileno por la aplicación del precursor ACC o en el mutante *eto1* (*ethylene overproducer 1*), que es un mutante en el que hay una sobreproducción de etileno, o en el mutante *ctr* que presenta un incremento en la señalización de etileno producen un descenso significativo del número de RL. Por el contrario, el bloqueo de la respuesta a etileno en los mutantes *etr1* (*ethylene triple response 1*) o *ein2* (*ethylene insensitive 2*) incrementa el número de RL. Se ha visto que la superproducción de etileno aumenta tanto el transporte acropétalo como basipétalo de IAA, y que este aumento del transporte no se ha detectado en mutantes insensibles a etileno como *etr1* y *ein2*, indicando que el etileno regula de forma positiva el transporte de auxina. Este aumento del transporte depende de AUX1 ya que el mutante *aux 1-7* es insensible a etileno (Negi *et al.*, 2008).

Ivanchenko *et al.*, (2008) analizaron el papel de la interacción auxina-etileno en la iniciación de la formación de RL y en el desarrollo del primordio. La aplicación de altas concentraciones de ACC inhíbe fuertemente la iniciación de nuevos primordios pero promueve la emergencia de los ya existentes. Por el contrario el incremento en la síntesis de etileno promovida por bajas concentraciones de ACC promueve la iniciación de RL. Un análisis genético utilizando mutantes para la señalización de auxina o la síntesis de auxina mediada por etileno como *wei2* y *wei7* (*weak ethylene insensitive 2*) que tienen defectos en la biosíntesis de auxina dependiente de triptófano y mediada por etileno (Stepanova *et al.*, 2005, 2007), indicó que el efecto del etileno en la iniciación de RL es mediado tanto por la síntesis como por la señalización de auxina (Ivanchenko *et al.*, 2008). Recientemente se ha implicado al gen *XBAT32* que codifica para una E3 ligasa de tipo RING con la regulación de formación de primordios mediada por etileno (Prasad *et al.*, 2010). Se ha visto que la proteína XBAT32 degrada vía ruta de la ubiquitina a las enzimas implicadas en la síntesis de etileno ACC4 y ACC7 por lo que el fenotipo del

mutante *xbat32* que presenta reducido el número de RL y primordios de RL podría explicarse por un aumento de los niveles de etileno en el mutante.

1.1.7.6 Interacciones hormonales

Aunque la formación de las raíces laterales está gobernada por la acción de varias hormonas, la auxina es el regulador central de este proceso. Esta variedad de actuaciones indica la complejidad del proceso y de las interacciones de la auxina con el resto de hormonas o de la interacción entre todas ellas en el desarrollo de RL. Por ejemplo, la interacción de la auxina con el etileno que afecta el transporte de auxina mediado por AUX1 en la raíz podría implicar también a los brasinoesteroides, ya que la interacción de la auxina con los brasinoesteroides modula el transporte acropétalo de auxina en la raíz. Generalmente una hormona suele afectar al transporte, la síntesis, el metabolismo o la señalización de otra. Así por ejemplo la auxina regula negativamente la biosíntesis de CK (Nordstrom *et al.*, 2004), el etileno induce la síntesis de auxina (Stepanova *et al.*, 2005, 2007), la auxina es necesaria para el crecimiento de la raíz mediado por GA (Fu y Harberd 2003) o el efecto positivo de los brasinoesteroides sobre la expresión de genes de respuesta a auxina (Nakamura *et al.*, 2003).

Es probable que la formación de RL esté regulada por una red de hormonas vegetales que interactúan entre sí. Asimismo, esta red está influenciada por diversos estímulos ambientales. Estas interacciones, aunque no se conocen en profundidad, juegan un papel importante durante la formación de RL (Fukaki *et al.*, 2009). Así los descubrimientos en un futuro próximo tendrán que ir encaminados a proporcionar información de cómo las interacciones hormonales junto con estímulos ambientales cooperan durante la iniciación, el desarrollo y la emergencia del primordio y cómo estos procesos determinan la creación de una arquitectura radicular correcta para las condiciones del suelo.

1.1.8 Función de la remodelación de cromatina en la formación de las raíces laterales

La remodelación de la cromatina es uno de los mecanismos que controlan la expresión génica. Como se comentó anteriormente, el mutante *slr1* tiene bloqueada completamente la iniciación de la formación de RL (Fukaki *et al.*, 2002, 2005). Posteriormente, estos autores llevaron a cabo una búsqueda de mutantes que suprimieran el efecto de *slr1* y que denominaron como *ssl2* (*supresor of slr 2*) (Fukaki *et al.*, 2006). El doble mutante *ssl2slr1* es capaz de producir RL y es sensible a auxina exógena en la formación de RL. Sin embargo el cuádruple mutante *ssl2slr1arf7arf19* no forma RL indicando que SSL2 es necesario para la inactivación de genes regulados por ARF7/19 mediada por IAA14. El gen *SSL2* o *PICKLE* es un homólogo del factor de remodelación de cromatina en animales *CHD3/Mi-2*. Este descubrimiento plantea una relación interesante entre la expresión génica mediada por auxina y la remodelación de cromatina. En animales, Mi2 reprime la transcripción como subunidad del complejo NuRD/Mi-2 que contiene histonas deacetilasas (HDAC) (Ahringer 2000). La inhibición de la actividad HDAC por tricostatina A (TSA) también produce la iniciación de la formación de RL en el mutante *slr-1*, pero no en el triple mutante *slr-1 arf7arf19* sugiriendo que se requiere una actividad normal de la actividad histona deacetilasa para la función de ARF7/19. Estos resultados sugieren que la remodelación de la cromatina mediada por *PKL/SSL2* regula negativamente la iniciación de la formación de RL en *Arabidopsis* a través de la función del módulo IAA14. Un descubrimiento reciente sobre la función del co-represor *TOPELESS* (TPL) en la inactivación de *ARF5/MONOTEROS* (MP) en la embriogénesis sugiere que la proteína TPL podría estar implicada también en la inactivación de los factores ARF7/19 mediada por el módulo IAA14-PKL (Szemenyei *et al.*, 2008).

1.2 La ruta de la ubiquitina en plantas

La ubiquitina (Ub) es un polipéptido de 76 aminoácidos que está altamente conservado en todos los organismos eucariotas. La modificación covalente de las proteínas diana con Ub, según sea monoubiquitinación o poliubiquitinación, está asociada a diferentes funciones en la célula, entre las que cabe resaltar el control de la progresión del ciclo celular, la biogénesis de orgánulos, la presentación de antígenos, la respuesta a estrés, la transducción de señales, el tráfico de proteínas, la reparación del ADN, la apoptosis, la regulación transcripcional y la degradación a través del sistema Ubiquitina/proteasoma 26S (UPS) (Pickart 2001). La unión de la Ub a las proteínas diana se produce a través de una cascada enzimática que comprenden tres enzimas principales: La enzima activadora de ubiquitina o **E1**, las enzimas conjugadoras o **E2** y las ubiquitin-ligasas o **E3**. La enzima E1, en una reacción dependiente de ATP, cataliza la formación de un enlace tioéster a través de un residuo de cisteína con el extremo carboxilo terminal (C-t) de la ubiquitina para transferirla de forma activada a la enzima E2. La enzima E2 carga la ubiquitina activada previamente e interacciona con la E3, quien reconoce específicamente a la proteína diana. Finalmente, la ubiquitina se une covalentemente a la proteína diana a través de un residuo interno de lisina y el grupo C-t de la Ub. El marcaje con Ub de las proteínas diana puede ser de diferentes tipos: mono-ubiquitinación, poli-mono-ubiquitinación y poli-ubiquitinación. En este último encontramos un complejo sistema de ensamblaje de Ub, ya que la cadena de poli-Ub se puede formar usando la misma lisina, formando una cadena final, o usando diferentes lisinas dentro de la molécula de Ub, formando cadenas de estructura compleja. En cada caso, estas diferentes estructuras tienen diferentes implicaciones biológicas que van desde la degradación de la proteína hasta la activación de la misma, entre otras (Hershko y Ciechanover, 1998). Para que una proteína diana se degrade a través del proteasoma parece ser requisito indispensable que esté marcada con al menos 4 moléculas de ubiquitina, que se ensamblan a partir de la lisina K48

(Wilkinson *et al.*, 2000, Doherty *et al.*, 2002, Smalle y Viestra, 2004). El proteasoma 26S es un complejo enzimático formado por el proteasoma 20S, que contiene los lugares activos de proteólisis, y dos partículas reguladoras 19S compuesta de varias subunidades designada como RPT (*regulatory particle triple A-ATPase*) (Rubin *et al.*, 1998). Estas partículas reguladoras son las encargadas de reconocer a las proteínas poli-ubiquitinadas. La proteólisis es un proceso dependiente de ATP que se produce una vez hayan sido eliminados los residuos de Ub por la acción de enzimas de-ubiquitininas situadas en las tapas del proteasoma (Fig. 6).

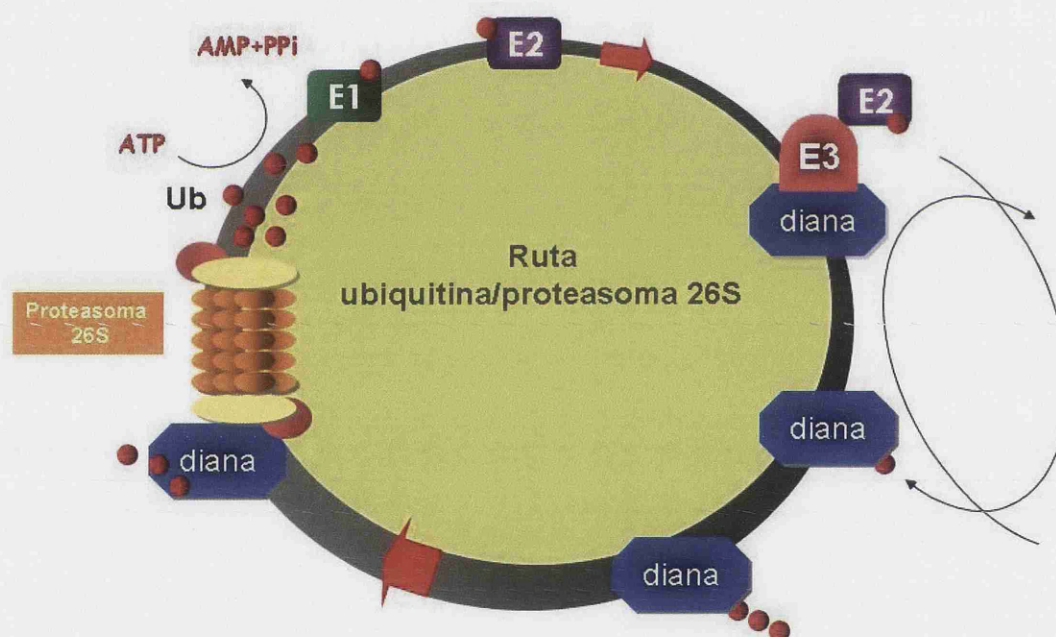


Figura 6. Ruta de la ubiquitina proteasoma.

Existen distintos inhibidores del sistema UPS. Por ejemplo, la Ub-aldehído que actúa bloqueando a las enzimas de-ubiquitininas de las proteínas reguladoras, o los compuestos MG132, MG115 o la epoxomicina, que bloquean a las actividades proteolíticas. En el primer caso se produce como consecuencia una acumulación de las proteínas poli-ubiquitinadas, mientras que con los otros inhibidores se produce una acumulación de las proteínas diana en general.

Gracias a la secuenciación del genoma de *Arabidopsis*, se han podido identificar 2 genes que codifican para enzimas del tipo E1, 45 genes que codifican para enzimas E2 y unos 1300 genes codificantes para enzimas E3. Como se comentó anteriormente, son las enzimas E3 las que reconocen específicamente a las proteínas diana, dando así especificidad al sistema. Estas E3 se dividen en dos grandes grupos (Fig. 7) según sea su dominio de unión a la proteína diana: RING/Ubox y HECT:

- RING (*Really Interesting New Gene*): La enzima E2 y la proteína a degradar quedan anclados en proximidad para que la E2 ceda su residuo de ubiquitina.
- HECT (*E6-Associated Carboxy-terminus*): La enzima E3 acepta el residuo de ubiquitina de la E2 y forma un nuevo enlace tioéster con la proteína diana para transferirle la ubiquitina.

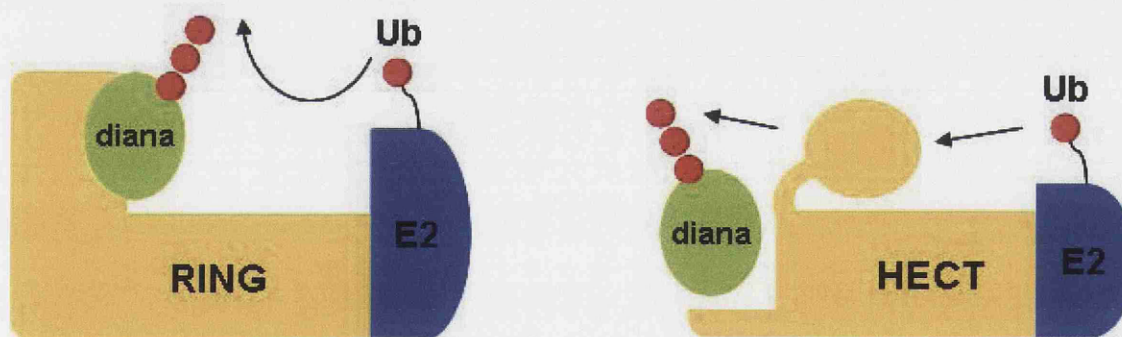


Figura 7. Clasificación de las enzimas E3 ubiquitina ligasas según su dominio de unión.

Uno de los tipos de enzimas RING más estudiados es el **complejo SCF** (*Skp1/Cullin/F-box*), que consta de 4 subunidades: CDC53 (CUL1), RBX, SKP1 (ASK1 en plantas) y proteínas con un motivo-F (Fig. 8). En este complejo SCF, la proteína CUL1 forma un eje central en el que se acoplan las restantes subunidades (Wiberlauer *et al.*, 2000). Se han descrito dos dominios dentro de la estructura de CUL1: Motivos A y B, directamente implicados en la interacción con las proteínas *F-box* y con las proteínas RBX, una proteína con dominio RING, cuya función es facilitar la transferencia de Ub desde las enzimas E2 hacia las proteínas diana (Zheng *et al.*, 2002).

CUL1 también interacciona con la proteína SKP1/ASK1 (*S-phase Kinase-Associated Protein 1*), que a su vez establece una conexión directa con el motivo *F-box*. Estas proteínas *F-box* son las unidades intercambiables en estos complejos, son las encargadas de reclutar las proteínas diana a través de su región Carboxílica (C-t). En la mayoría de los casos, la región C-t es rica en repeticiones de leucina (Fb1) o en repeticiones de tipo WD40 (Fbw) (Skowyra *et al.*, 1997, del Pozo y Estelle, 2000). En plantas, se han descrito 2 subunidades para RBX, 5 para CUL y 21 para ASK (Farras *et al.*, 2001). Recientemente se han descrito nuevos dominios, específicos de plantas, que posiblemente estén implicados en el reconocimiento de diversos tipos de proteínas diana (Gagne *et al.*, 2002).

Gracias a la secuenciación del genoma de *Arabidopsis thaliana* y a su posterior análisis bioinformático, se ha encontrado que aproximadamente un 5% de su proteoma pertenece a este sistema de degradación ubiquitina/proteasoma 26S. En *Arabidopsis* existen mas de 700 proteínas *F-box* distintas, un número muy superior que el encontrado en otros organismos eucarióticos (14 en *Saccharomyces cerevisiae* y 74 en humanos) lo que sugiere que este sistema de regulación por proteólisis específica juega un papel muy importante en la señalización de plantas (Risseeuw *et al.*, 2003).

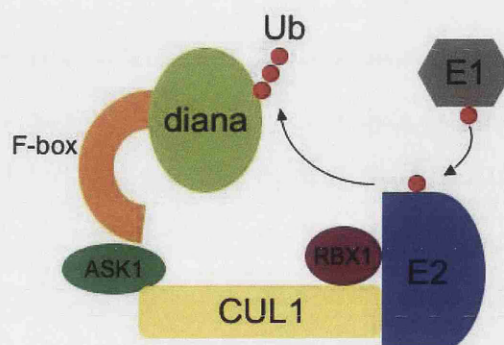


Figura 8. Subunidades que componen los complejos SCF en plantas.

1.3. *Arabidopsis thaliana* COMO ORGANISMO MODELO PARA EL ESTUDIO DE LA FORMACIÓN DE RAICES LATERALES EN PLANTAS.

Arabidopsis thaliana es una pequeña crucífera que gracias a su reducido tamaño, pequeño genoma y fácil manipulación genética ha llegado a ser uno de los más importantes sistemas para el estudio de muchos aspectos de la biología de las plantas. Sus características únicas ofrecen una serie de ventajas a la hora de considerarla como modelo de investigación. Es un verdadero diploide con un ciclo de vida muy corto (6-8 semanas), de fecundación autógama, y produce numerosas semillas que permanecen viables durante varios años a temperatura ambiente (Gómez-Campo, 1976). Por el tamaño final de la planta (30 cm aproximadamente) permite siembras de hasta 10.000 plantas/m² (Meyerowitz, 1987). Su rápido crecimiento permite el análisis de un gran número de individuos en un mínimo espacio y por lo tanto, la consiguiente amplificación rápida de los genotipos útiles para posteriores estudios. Los cruzamientos son relativamente fáciles de realizar y sencillos de mantener (por su capacidad de autofecundación). Su compacto genoma, con relativamente escasas secuencias repetidas, y un bajo contenido en ADN (aproximadamente 100 Mb por núcleo haploide, unas 25 veces el tamaño del genoma de *Escherichia coli*), la hacen con diferencia, la planta superior de genoma más pequeño conocido, y por lo tanto, un sistema ideal para estudios genéticos y moleculares. Puede ser fácilmente transformada utilizando *Agrobacterium tumefaciens*, y mediante el plásmido Ti es posible introducir genes de interés y mantenerlos de forma estable. Por ejemplo, mediante la transformación de plantas con fusiones de los promotores de genes de interés a genes marcadores como el GUS permite un estudio de la expresión espacio-temporal relativamente simple. Además, los genes de estudio pueden ser sobreexpresados o bloqueados fácilmente mediante promotores constitutivos, o mediante la transformación con genes antisentido o microARNs artificiales. *Arabidopsis thaliana* presenta las características típicas de otras angiospermas en anatomía, morfología,

crecimiento, desarrollo y respuesta al ambiente, por lo que los resultados obtenidos en investigación con esta especie son potencialmente aplicables a cualquier otra planta (Meyerowitz, 1989).

La simplicidad del genoma de *Arabidopsis*, el hecho de que éste se haya secuenciado rápidamente, la existencia de centros de conservación, distribución de estirpes y de clones de ADN (NASC, ABRC, SENDAI) y el desarrollo de numerosas herramientas informáticas, la hacen muy atractiva no sólo para estudiar la regulación y función de genes implicados en la regulación de la formación del sistema radicular desde el marcaje de las células del periciclo para la formación del primordio, como el desarrollo del primordio o la emergencia sino también transferir los resultados de la manipulación del sistema radicular a otras especies de interés agronómico.

En este trabajo se describe al gen *SKP2B* (At1g77000) que codifica para una proteína de tipo F-box que forma parte de un complejo SCF. Estudios de expresión de este gen mediante análisis histoquímicos han mostrado que este gen es un marcador de las células fundadoras de los primordios de RL. *SKP2B* se expresa en el meristemo basal durante el marcaje de las células fundadoras, y se mantiene a lo largo del desarrollo del PRL (antes de la primera división asimétrica hasta la emergencia del primordio). Se ha utilizado la expresión de *SKP2B* fusionando el promotor al gen de la GFP para realizar experimentos de cell-sorting y posteriores análisis transcriptómicos de estas células. Así hemos identificado casi 200 genes que se expresan diferencialmente en primordio y hemos analizado la función de 3 de estos genes durante el marcaje y el desarrollo del primordio. Por otro lado, se han utilizado plantas transgénicas con el promotor del gen *SKP2B* fusionado al gen GUS para una mutagénesis con EMS (Etilmetanosulfonato) y posterior búsqueda de mutantes con un patrón de expresión alterado para el gen *SKP2B* que hemos denominado como mutantes *sbrel* (*skp2b* *root* *expresión* *less*). Mediante esta estrategia hemos identificado varios mutantes que muestran alteraciones en el sistema

radicular. En este trabajo nos hemos centrado en la caracterización de 2 de estos mutantes: *sbrel50* y *sbrel53*. El mutante *sbrel50* presenta un aumento del número de RL y una drástica reducción del tamaño de la raíz principal. El mutante *sbrel52* presenta un reducido número de RL y una acumulación de primordios en estadio IV. Por otro lado, para abordar la regulación de la expresión de *SKP2B* se han realizado experimentos de un híbrido de levaduras y hemos identificado un factor de transcripción de tipo ERF. Por último hemos encontrado que *SKP2B* tiene una regulación de la expresión mediada por intercambio de histonas y por complejos de modificación de la cromatina como el complejo CAF.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Estudio funcional del gen *SKP2B*.
2. Papel de *SKP2B* en el desarrollo radicular.
3. Identificación y caracterización funcional de genes implicados en la formación de las células fundadoras y de los primordios de raíces laterales.
4. Identificación de nuevos mutantes con un patrón de desarrollo radicular alterado.



MATERIALES

3. MATERIALES

3.1 Material vegetal

Se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo *Columbia* (Col-0) para generar las líneas transgénicas.

3.2 Cepas de bacterias y levaduras

Bacterias:

- Los clonajes se realizaron en *Escherichia coli* cepa DH5α.
- La propagación de los vectores Gateway se realizó en la cepa DB3.1.
- Para la infección en plantas se usó la cepa C58C1 de *Agrobacterium tumefaciens*.
- En la inducción de proteínas se usó la cepa BL21 pLys Rosetta de *E.coli*.

Levaduras: Cepas HF7C y Y187 de *Saccharomyces cerevisiae*

3.3 Medios de cultivo

Crecimiento de plantas y cultivos celulares	Casa Comercial
Agar Plant	DUCHEFA
Macronutrientes MS (Murashige y Skoog, 1962)	DUCHEFA
MES 2-(N-Morpholino)-ethanesulfonic acid	DUCHEFA
Micronutrientes MS (Murashige y Skoog, 1962)	DUCHEFA
MS (Murashige y Skoog, 1962)	DUCHEFA
Sacarosa	MERCK

Crecimiento de bacterias y levaduras	Casa Comercial
Agar bacteriológico	PRONADISA
LB	DUCHEFA
YEPD	DIFCO

3.4 Vectores y oligonucleótidos

Vectores	Casa Comercial
pGWB3	Nakagawa <i>et al.</i> , (2007)
pDONR221	INVITROGEN
pDEST32	INVITROGEN
pDEST22	INVITROGEN
pY189	INVITROGEN
pER8	Zuo <i>et al.</i> , (2000)
pGST-2T	AMERSHAM
pMBP	NEW ENGLAND BIOLABS

Oligonucleótidos

NOMBRE	POSICIÓN	OLIGO	USO
SKP2B	Sentido	ATGGTGAGTGAAGGAGCAAC	cDNA
SKP2B	Antisentido	ATGCGCCGGGTGAGGGTAAACG	
CYCB1;1	Sentido	ATGATGACTTCTCGTTCGATTGTTC	cDNA
CYCB1;1	Antisentido	CTAAGCAGATTCAGTTCGGGTCAA	
Histona H4	Sentido	ATGTCAGGAAGAGGAAAAGG	cDNA
	Antisentido	TCAACCACCAAATCCATATAGAG	
ASK1	Sentido	ATGTCTGCGAAGAAGATTGTGTT	cDNA
	Antisentido	TCATTCAAAAGCCCATTGGTTCT	
ASK2	Sentido	ATGTCGACGGTGAGAAAAATCA	cDNA
	Antisentido	TCATTCAAAAGCCCATTGGTTCT	
ASK6	Sentido	ATGATGATAAAGGGTATGGCAGA	cDNA
	Antisentido	TCAGCGACAGTTTGAAATGTGAG	
ASK8	Sentido	ATGTCGACGAAAAAGATCATGTT	cDNA
	Antisentido	TCATTCAAAAGCCCATTATTCTC	
ASK10	Sentido	ATGTCGACGAAGAAGATCATATT	cDNA
	Antisentido	TCATTCAAAACCCCATTGATTC	
ASK14	Sentido	ATGTCTTCCAACAAGATTGTT	cDNA
	Antisentido	CTATTCAAAAGCCCATGCGTTTTC	
ASK18	Sentido	ATGGCTTCTTCTTCCGAAGAGAT	cDNA
	Antisentido	TTACTCATTAAAAGTCCAAGCAT	
SKP2BG3	Sentido	TCTTTGGACGTTATCTCTCG	PROMOTOR
SKP2BG2	Sentido	CTGGAAAAATCCATCCAGCAA	PROMOTOR
SKP2BG7	Sentido	ACTCCTTTTTGATTTTGTC	PROMOTOR
SKP2BG8	Sentido	AGAAACCAAGGCACCGA	PROMOTOR
SKP2BG5	Sentido	CCAAAGTTTGTATCCTTTTG	PROMOTOR
SKP2BG6	Sentido	CTCCTAAATTTTGTCTC	PROMOTOR
SKP2BG1	Antisentido	TGCTCCTTCACTCACCATCCT	PROMOTOR
SKP2B annealing	Sentido	AGCTTCTACGCTAGTCACTACGCT	PROMOTOR
SKP2B annealing	Antisentido	TCGACTGACTAGCGTAGTGACTAG	PROMOTOR
SKP2B1kbmut	Sentido	ACTGTCCTACGATAGTCAATGGA	PROMOTOR

NOMBRE	POSICIÓN	OLIGO	USO
IAA14	Sentido	ATGAACCTTAAGGAGACGGA	cDNA
IAA14	Antisentido	TCATGATCTGTTCTTGAAC TTC	cDNA
RAP2.3	Sentido	ATGTGTGGCGGTGCTATTATTTTC	cDNA
RAP2.3	Antisentido	TTACTCATACGACGCAATGACATC	cDNA
TCP24	Sentido	ATGGAGGTTGACGAAGACATTGAG	cDNA
TCP24	Antisentido	CTATCTCCTTTTCCTTTGCTTGTC	cDNA
AMMECR1	Sentido	ATGGTGTGCGGCGAACAGAGAAA	cDNA
AMMECR1	Antisentido	TCAGGCAAAGGCGTGCTTGTG	cDNA
pACT2-F	Sentido	TCTGGATCTACTTTATTTGCTG	PROMOTOR
pACT2-R	Antisentido	TACACAACTTCATCTAACCTT	PROMOTOR
pCYCB1-F	Sentido	TCTCTAAACC GTACTAATTC	PROMOTOR
pCYCB1-R	Antisentido	CTTAGTGTTCTCTTCTCTTT	PROMOTOR
pAt4g30450-F	Sentido	CACCCTAACATGTCTTTTAAAGTGG	PROMOTOR
pAt4g30450-R	Antisentido	AGCTTTGGGATTGTGTGAGC	PROMOTOR
ChIP-SKP2B-Fa	Sentido	CTGCCCCATTAGAGCAAAAA	PROMOTOR
ChIP-SKP2B-Ra	Antisentido	TGAGGGATTTTTGCTGGTGTA	PROMOTOR
ChIP-SKP2B-Fb	Sentido	ACCAGCAAAAATCCCTCAAGT	PROMOTOR
ChIP-SKP2B-Rb	Antisentido	CCTCTGAAATCGTGTCTTCG	PROMOTOR
ChIP-SKP2B-Fc	Sentido	CGAAGAACACGATTTCAAGG	PROMOTOR
ChIP-SKP2B-Rc	Antisentido	CATCCTTGAAGCGGTTCTTT	PROMOTOR
ChIP-SKP2B-Fd	Sentido	TGGTGAGTGAAGGAGCAACA	PROMOTOR
ChIP-SKP2B-Rd	Antisentido	GAACAAACAACAAGCAAAACAC	PROMOTOR
pPIN6-ChIP-F	Sentido	ATTGAGAATGATTATACGGG	PROMOTOR
pPIN6-ChIP-R	Antisentido	ATATAGAGACTTGTGACG	PROMOTOR
LSU3Fw	Sentido	GGAGATAGAACCATGGGAAAAGGAGGAG	cDNA
LSU3Rev	Antisentido	CCAGAAAGCTGGGTCCGAATTCGTAACAACG	cDNA
ESR1ΔFw	Sentido	GGAGATAGAACATGTTTCTCAAGAAGAAAGCTGATG	cDNA
ESR1ΔRev	Antisentido	CCAGAAAGCTGGGTCCCAGTTCCACGGTCTGG	cDNA
SBR1Fw	Sentido	GGAGATAGAACCATGTCTGCGATTGTTTGC	cDNA
SBR1Rev	Antisentido	CCAGAAAGCTGGGTCAAGACGTCTGGATGG	cDNA
XBAT32	Sentido	GGAGATAGAACCATGAGGTTTC TAAGCCTCG	cDNA
XBAT32	Antisentido	CCAGAAAGCTGGGTGCGAAGCACTTCCACCGG	cDNA
Xbatpcr1Fw	Sentido	CAAAATGAGGATGATGCAG	Genómico
Xbatpcr2Rev	Antisentido	CTCCACACCAAAAATGAGTTG	Genómico
Xbatpcr3Fw	Sentido	GATGTGGACTCGAGAGAAC	Genómico
Xbatpcr4Rev	Antisentido	CCAATAGCCGGAATTCGCGCG	Genómico
Xbatpcr5Fw	Sentido	GGAGAAAGCTTTCTTATGGTG	Genómico
Xbatpcr6Rev	Antisentido	GGATCAACCCTAACAAATCACC	Genómico
Xbatpcr7Fw	Sentido	GCTGGTTCTCGAATTGGG	Genómico
Xbatpcr8Rev	Antisentido	GCCGCAAGGTGTAAAGCAG	Genómico
Xbatpcr9Fw	Sentido	CAGGGATATTGGAACAATG	Genómico
Xbatpcr10Rev	Antisentido	CCCTTACTGATCAAAAGCTG	Genómico
Xbatpcr11Fw	Sentido	CACGCAGTGTGCCCAGG	Genómico
Xbatpcr12Rev	Antisentido	GGGGAAGTTTGGTGAAAG	Genómico
Xbatpcr13Fw	Sentido	CGTCAAAGACCTCAAACGTC	Genómico
Xbatpcr14Rev	Antisentido	CAATGTAATGGCAAGGCC	Genómico
Xbatpcr15Fw	Sentido	GTGCTAATTGATTCTGTG	Genómico

NOMBRE	POSICIÓN	OLIGO	USO
Xbatpcr16Rev	Antisentido	GGCATTATCCTCGCTGAGC	Genómico
Yip FwGw	Sentido	GGAGATAGAACCGCGCGTGGATCGTTCTTTC	cDNA
Yip RevGw	Antisentido	CCAGAAAGCTGGGTCGCGGATATGTTCCCTTCTTCTAC	cDNA
ELF6 FwGw	Sentido	GGAGATAGAACCCCGATTGTGCGACAAGGTG	cDNA
ELF6 RevGw	Antisentido	CCAGAAAGCTGGGTCGAGCAGCTCCTTGAACAC	cDNA
DAR2 PCR1Fw	Sentido	CCGATCTCTTCTGCAAAG	Genómico
DAR2 PCR1Rev	Antisentido	CCAACGAGACTCATGACA	Genómico
DAR2 PCR2 Fw	Sentido	CTTTGAATGAGTCGGTCCA	Genómico
DAR2 PCR2 Rev	Antisentido	CCATACCCTGCACGATTTA	Genómico
DAR2 PCR3 Fw	Sentido	CCGTTCAATTTCACTTTCTCT	Genómico
DAR2 PCR3 Rev	Antisentido	CAAACCTTCGCATTTGGGAT	Genómico
DAR2 PCR4 Fw	Sentido	GTGACTAAGGTTGTGTGTT	Genómico
DAR2 PCR4 Rev	Antisentido	CAGACAAGCATAAACCTCTT	Genómico
DAR2 PCR5 Fw	Sentido	CGTAGGAGAGAAAAACGTA	Genómico
DAR2 PCR5 Rev	Antisentido	GAGAACTTCAGATTCAAGCC	Genómico
DAR2 PCR6 Fw	Sentido	GTGTTATATGCTACATCTG	Genómico
DAR2 PCR6 Rev	Antisentido	GATTATCATTCATCAGCAAT	Genómico
DAR2 PCR7Fw	Sentido	GTGCTCACACTAATCATCATCC	Genómico
DAR2 PCR7Rev	Antisentido	CTCCTTATTGAACCAACCTT	Genómico
TOPP4 FwGw	Sentido	GGA GAT AGA ACC CGTTTCTGATACTTTAAT	cDNA
TOPP4 RevGw	Antisentido	CCAGAAAGCTGGGTCCATCATACTAAACCTT	cDNA
MYB25FwGw	Sentido	GGAGATAGAACCGAGGACCCCGGTTGGTTT	Genómico
MYB25RevGw	Antisentido	GGAGATAGAACCGAGGACCCCGGTTGGTTT	Genómico
miR393aFw	Sentido	GTACAGAAACGTAGACGTCTGG	Genómico
miR393aRev	Antisentido	GTAGGCTTGAGATACAAGGTTG	Genómico
ARMFwGw1	Sentido	GGAGATAGAACCGAAAACACAAAACCCAAATTG	Genómico
ARMRevGw1	Antisentido	CCAGAAAGCTGGGTCGGGTGGATTTTAGTAACAAG	Genómico
ARMFwGw2	Sentido	GGAGATAGAACCGCTTCCGATGATGAGATTTGG	Genómico
ARMRevGw2	Antisentido	CCAGAAAGCTGGGTCCACACAGTGGGTGGTCATGTATCC	Genómico
Folt1fGwGw	Sentido	GGAGATAGAACCATGTCGGACGCTTTGATCAATGG	cDNA
Folt1revGw	Antisentido	CCAGAAAGCTGGGTCGCTAGAGGTAGCGTTTGAGAGC	cDNA
ELF2FwGw1	Sentido	GGAGATAGAACCGAGTATTCATTTCATTAGTCCAAG	Genómico
ELF2RevGw1	Antisentido	CCAGAAAGCTGGGTCGAGGAATGAGGACTGTTATG	Genómico
ELF2FwGw2	Sentido	GGAGATAGAACCGGTTGATGCTGAGAGAGTCGG	Genómico
ELF2RevGw2	Antisentido	CCAGAAAGCTGGGTCTCTTTCAATGTAACATAGC	Genómico
60S FwGw2	Sentido	GGAGATAGAACCCCTCCATTTTCTCTACCCCA	cDNA
60S RevGw2	Antisentido	CCAGAAAGCTGGGTCGTTTCTTGAATGTGGTTGCG	cDNA
60S FwGw3	Sentido	GGAGATAGAACCCCTTGAAGGTGGATAGGTG	cDNA
60S RevGw3	Antisentido	CCAGAAAGCTGGGTCGTTGCTGGAGTATTGTCTGTT	cDNA
ELF4Fw	Sentido	GGAGATAGAACCATGAAGAGGAACGGCGAGACG	cDNA
ELF4Rev	Antisentido	CCAGAAAGCTGGGTCAGCTCTAGTTCGGCAGCACC	cDNA

Anticuerpos	Proteína detectada	Casa comercial o donante
Streptavidin peroxidase	Moléculas/proteínas biotiniladas	GE HEALTHCARE

3.5 Soluciones y tampones

- **Tampón GUS:** 5 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7.0, 40 nM K₄Fe(CN)₆, 40 nM K₃Fe(CN)₆, 0,004% de tritón X-100 y 5µg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indol-β-glucurónico (X-Gluc).
- **Tampón Laemmli:** 10mM de EDTA, 0,1% xilencianol, 0,1 % azul de bromofenol, y 30% de glicerol.
- **Tampón TBE 1x:** 89 mM Tris-HCl, 89 mM ácido bórico, 2mM EDTA.
- **Tampón TBS:** 0.5:100 mM de Tris-HCl pH 7.5, 150 mM de NaCl y 0.5% de NP-40.
- **Tampón TE:** 10 mM Tris-HCl pH 8,1 mM de EDTA.
- **Tampón para electroforesis de proteínas SDS-PAGE 10x** 0,025M Tris-HCl, 0,2M glicina, 0,1% SDS. Enrasar hasta 1L de agua MQ. pH 8,3. Diluir a 1x para su uso.
- **Tampón de transferencia 10x** 25 mM Tris, 192 mM glicina, pH 8.3. Para su uso 1x, diluir en agua MQ y añadir metanol al 20% de la concentración final.

Otros reactivos

2,4-D (ácido 2,4-Diclorofenoxiacético)
3AT (3-amino-1,2,4-triazol)
5-HYDROXY-1,4-NAPHTHOQUINONE
ABA (ácido abscísico)
Agarosa
Acrilamida
Antibióticos
ATP (adenosín trifosfato)
Benzamidina
Bradford
Chemiblocker

Casa comercial

DUCHEFA
SIGMA
ALDRICH
DUCHEFA
PRONADISA
BIORAD
DUCHEFA
SIGMA
SIGMA
micro BCA de PIERCE
MILLIPORE

Creatina kinasa	SIGMA
Cóctel inhibidor de proteasas vegetales	SIGMA
DMSO (dimetilsulfóxido)	SIGMA
DTT (ditiotreitól)	SIGMA
El enzima activadora de ubiquitina	BIOMOL
Sustrato químico luminiscente HRP	MILLIPORE
Enzimas de restricción/modificadoras del ADN	ROCHE, FERMENTAS
Epoxomicina	AFFINITY
Etanol	BAKER
Fosfocreatina	SIGMA
Glicerol	MERCK
IAA (ácido indol-3-acético)	DUCHEFA
Isopropanol	BAKER
Membranas de nitrocelulosa	AMERSHAM
Metanol	BAKER
MgCl ₂	DUCHEFA
MgSO ₄	DUCHEFA
Na ₂ HPO ₄	DUCHEFA
NaCl	MERCK
NaH ₂ PO ₄	DUCHEFA
NP-40	FLUKA BIOCHEMIKAL
PBS (tampón fosfato salino)	SIGMA
PMSF (fluoruro de fenil metil sulfonilo)	ROCHE
Resina Amylosa (MBP)	NEW ENGLAND BIOLABS
Silvet L-77	LEHLE SEEDS
Syber Green I	ROCHE
Syber Safe INVITROGEN	INVITROGEN
Tiourea	AMERSHAM
Tris-HCl	DUCHEFA
Tritón X-100	SIGMA
Trizol	INVITROGEN
Tween-20	SIGMA
Ubiquitina biotinilada	BIOMOL
Urea	AMERSHAM
X-GAL (5-bromo-4-cloro-3-indolil- betagalactopiranosido)	DUCHEFA
X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indol-8- glucurónico)	DUCHEFA
Yoduro de propidio	SIGMA

MÉTODOS

4. MÉTODOS

4.1 AISLAMIENTO Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

4.1.1 Extracción y análisis de ADN

La extracción de ADN plasmídico y las digestiones con enzimas de restricción se realizaron según el protocolo de Sambrook *et al.*, 1989. Las enzimas de restricción se utilizaron según las recomendaciones de la casa comercial.

Las electroforesis de ADN se realizaron en geles de agarosa al 1.2% usando un patrón de bandas de peso molecular conocido, y tiñendo con Syber Safe. El patrón de bandas se visualizó con el sistema de documentación de geles *Gel-Doc* (BIORAD).

Para el genotipado de plantas de *Arabidopsis* se obtuvo DNA genómico de aproximadamente una hoja de material fresco que fue procesada en un tubo eppendorf conteniendo bolas de vidrio de 1 mm de diámetro, después de haber depositado el tejido y haber congelado su contenido en N₂ (l), los tubos fueron introducidos en un molino agitador (SILAMAT 5s, Schaan, Principality of Liechtenstein) con el fin de que las bolas cizallen y muelan la muestra congelada. Finalmente, el ADN genómico se extrajo siguiendo el protocolo descrito por Bernatzky y Tanksley (1986). La determinación de las concentraciones de las soluciones de ADN, se realizó en geles de agarosa al 1% en TBE (p/v) mediante la comparación con muestras de ADN de concentración conocida, o bien determinando la absorción a 260 nm en un espectrofotómetro (NanoDrop ND-1000, Thermo Scientific, USA).

4.1.2 Extracción y análisis de ARN

El material vegetal se homogenizó en nitrógeno líquido y el ARN se extrajo con Trizol. Tras 5 minutos a temperatura ambiente (RT) se añadió cloroformo y se centrifugó durante 10 min/RT. La fase soluble se traspasó a tubos nuevos y se precipitó el ARN con isopropanol. Finalmente se lavó con

etanol 75% y se resuspendió en agua filtrada y auto clavada, libre de ADNasas/ARNasas.

Los niveles de expresión de los ARNs extraídos se analizaron mediante RT-PCR semiQ con el kit *RT-un paso* (INVITROGEN). Se cuantificó la presencia de actina de los ARN en cada alícuota para normalizar las muestras. La expresión de los genes se analizó mediante el uso de oligonucleótidos específicos diseñados para eliminar posibles contaminaciones con ADN genómico, diseñando estos oligonucleótidos en los pasos intrón-exón.

4.2 CONDICIONES DE CULTIVO

Condiciones de cultivo de plantas

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* se sembraron en una mezcla de sustrato universal y vermiculita (proporción 3:1), o en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) para cultivo *in vitro*. En el caso del cultivo *in vitro*, las semillas se esterilizaron previamente durante diez minutos en una solución con lejía al 70% y se aclararon tres veces con agua estéril. A continuación, las semillas se sembraron en placas Petri con medio MS suplementado con sacarosa al 1% y Plant-agar al 0.7% en placas Petri para crecimiento en horizontal. Para los estudios radiculares las semillas se crecieron en vertical en placas cuadradas con un 1% de Plant-agar.

Las cámaras de cultivo *in vitro* presentaban las siguientes condiciones: 22°C de temperatura, 65% de humedad relativa e iluminación con luz fluorescente blanca fría y fotoperiodo de día largo (16h luz/8h oscuridad). Para seleccionar plantas transgénicas provenientes de una transformación se añadieron antibióticos a las placas Petri a una concentración final de 50 µg/ml.

Condiciones de cultivo de bacterias, obtención de competentes y transformación de *E. coli*

El crecimiento de las cepas bacterianas de *E.coli* se realizó en medio LB a 37°C durante 12 horas, con el correspondiente medio selectivo, y en agitación en el caso de medios líquidos.

Las células competentes se elaboraron según el protocolo de Sambrook *et al.*, (1989), y la transformación de células por el método de Birnboim y Doly (1979).

Condiciones de cultivo y transformación de levaduras

Las levaduras se crecieron en medio YPD (DIFCO) a 30°C a 200 rpm. La transformación de levaduras se realizó por el método de Clontech (Clontech, PT3529-1; [http://www.clontech.com/ images /pt /PT3529-1.pdf](http://www.clontech.com/images/pt/PT3529-1.pdf)).

4.3 UN HÍBRIDO.

Se clonó la region promotora de SKP2B de 410pb aguas arriba del ATG en el vector adaptado a Gateway pHisSi-1 para la preparación del clon de levaduras con el promotor de SKP2B fusionado al reportador HIS3. La construcción se linearizó con XhoI y se utilizó 1 µg para transformar en la cepa Y187. Se utilizó el protocolo de transformación descrito por Clontech (Clontech, PT3529-1; [http://www.clontech.com/ images /pt /PT3529-1.pdf](http://www.clontech.com/images/pt/PT3529-1.pdf)). La integración y la integridad de la construcción se verificaron por PCR y secuenciación. Una vez obtenido el clon de levaduras con el ADN de 0.41KbSKP2B:HIS3 se transformó con una librería de ADNcs procedentes de plantas de 5 días tratadas con auxina según el protocolo descrito anteriormente por Clontech (Proporcionadas por W. Gray, sin publicar). La búsqueda de clones positivos se realizó en medio mínimo sin Leucina, Triptófano e Histidina y con 5 mM de 3AT (3-amino-Triazol). De una transformación de 1.2 millones de transformantes se obtuvieron 10 clones

positivos. Estos clones se recrecieron en medio mínimo sin histidina y con concentraciones crecientes de 3AT de 10, 15 y 20 mM. El ADN de los clones positivos se amplificaron por PCR y se secuenciaron.

4.4 DOBLE HÍBRIDO

Para el doble híbrido se clono el ADNc de XBAT32 en el vector de levaduras pDEST32 y se transformó la cepa de levaduras HF7C según el protocolo de Clontech. Una vez obtenido un clon positivo se transformó por el protocolo de Clontech con una librería de ADNcs procedentes de plantas de 5 días tratadas con auxina según el protocolo descrito anteriormente de Clontech (Proporcionadas por W. Gray, sin publicar). De una transformación de 2 millones de transformantes se obtuvieron 10 clones positivos. Estos clones se recrecieron en medio mínimo sin histidina y con concentraciones crecientes de 3AT de 10, 15 y 20 mM. El ADN de los clones positivos se amplificó por PCR y se secuenció.

4.5 ENSAYOS DE *LACZ* E *HIS3*

En los experimentos de dos híbridos de levaduras se usaron plásmidos pGAD y pGBT8, adaptados al sistema Gateway para generar las distintas construcciones por recombinación. El promotor de la alcohol deshidrogenada I (*AdhI*) se fusionó al dominio de activación de ADN (GAL4D; vector pGAD) o al dominio de unión de ADN (Gal4BD; vector pGBT8) para generar fusiones con *ASKs* y *SKP2B* ORFs. El cDNA codificante para ASK1, ASK2, ASK6, ASK8, ASK10, ASK14, ASK18 y SKP2B se introdujo en el vector Gateway pDNR221. Los cDNAs de los distintos ASK se transfirieron a pGAD y el de SKP2B a pGBT8. Se usaron cadenas haploides de *Saccharomyces cerevisiae* HF7C con genes reporteros *LacZ* e *HIS3* bajo el control del promotor truncado de Gal1 que contiene elementos de respuesta a Gal4 (Gal1UAS). Tras la transformación, las levaduras se crecieron en medio selectivo sin histidina. Las colonias que crecieron en el medio se analizaron mediante la inducción de la actividad β -galactosidasa, incubando las células en placas con X-Gal (80 μ g/ml) durante 3

días. Aquellas levaduras productoras de β -galactosidasa que se tiñeron de azul, fueron consideradas como “positivas en interacción”.

4.6 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Las proteínas de interés se clonaron en fase de lectura en vectores que expresan bien la proteína GST (*Glutation –S– transferasa*) o la proteína MBP (*Maltosa binding protein*). Estas proteínas de fusión se expresaron en la cepa BL21 Rosetta de *E.coli*. La inducción de proteínas se realizó con IPTG 0,4 mM durante 2 h a 37°C. El cultivo se centrifuga y se resuspende en una solución de PBS-Tween 20 0,1%, 1mM PMSF y 25 μ M de benzamidina. Las muestras se sonicaron en frío 3 x 15 segundos y se incubaron con bolas pre-lavadas de GST o MBP durante 1h en agitación a 4°C. Posteriormente se lavaron 3 x 10 minutos en agitación a 4°C con PBS-Tween 20 0,1% y se conservaron en esta solución con un 10% de glicerol a -80°C. Las proteínas se cuantificaron por western-blot usando geles SDS-PAGE, teñidos con Sypro-Ruby o azul de *coomasie*.

4.7 EMSA

Para la unión *in vitro* de la proteína RAP2.3 a la region promotora 0.41KbSKP2B se amplificó la región promotora por PCR utilizando el primer en 5' biotinilado (Invitrogen). El producto de PCR se purificó de gel de agarosa y se cuantificó con un espectofotómetro. El ensayo de EMSA se llevo en un volumen de reacción total de 20 μ l y en buffer de unión ((25mM Hepes-KOH pH 7.5, 40mM KCl, 0.1mM EDTA, 300ng dIdC). Se utilizaron 20 femtomoles de sonda biotinilada y 200 ng de proteína recombinante. La reacción se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las mezclas de reacción se corrieron en un gel no desnaturizante al 4% durante 60 minutos a 100V. El gel se transfirió a una membrana de nylon durante 60 minutos a 60V. Se aplicó crosslinking con luz UV (1200Kj). Para el bloqueo se incubó la membrana con buffer PerfectHyb™ hybridization (Sigma) durante 30 minutos. Para la detección de la unión proteína-ADN y

la sonda sola se incubó la membrana en un volumen final de 40 ml con una dilución 1:40000 de la proteína Streptavidin-HRP (Amersham Biosciences/GE Healthcare) durante 1 hora. La detección se hizo con ECL de Millipore.

4.8 INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (ChIP)

Para determinar el enriquecimiento de una u otra variante histónica H3.3 o H3:1 en el promotor de SKP2B o en los genes control se utilizaron plantas transgénicas con el promotor y la secuencia codificante de la histona H3.1 (At3g27360) y la H3.3 (At4g40030) fusionadas al epitopo MYC utilizando el vector binario pGWB16 (Nakagawa *et al.*, 2007). Los ensayos de ChIP y el análisis de datos se realizaron como se había descrito previamente (Ramírez-Parra *et al.*, 2007), fijando las raíces en presencia de 3mM de Butirato de Sodio (Sigma) y utilizando los antiMYC-4A6 Millipore-Upstate, #16-213) y anti-H3ac (Millipore-Upstate, #06-599). El ADN inmunoprecipitado se cuantificó utilizando PCR semicuantitativa con primers específicos para cada promotor. El número de ciclos se calculó empíricamente para cada promotor. El producto de PCR se separó en gel de agarosa y las bandas se cuantificaron como se describió en Ramírez-Parra *et al.*, (2007). Los datos corresponden a la media de dos experimentos biológicos independientes y tres réplicas de PCR.

4.9 CELL SORTING Y ANÁLISIS DE MICROARRAY EN CÉLULAS SKP2B:GFP

Para analizar el perfil transcriptómico de las células fundadoras y los primordios en estadio I y II, se separaron las células GFP positivas de plantas SKP2B:GFP de 5 días y se hizo una extracción de ARN. Se prepararon 2 tipos de muestras por triplicado. S1) Raíz entera, S2) Meristemo raíz principal. En ambos casos se cortaron y segmentaron las

raíces. La generación de protoplastos y el cell sorting se hizo como se describió previamente por Birnbaum *et al.*, (2005) utilizando el equipo Beckman Coulter Epics Altra flow sorter, equipado con laser Argon 488nm, 100µm de flujo celular y una presión de 9 p.s.i. El ARN total se preparó para un hibridación de un microarray individual utilizando el array de Affymetrix ATH-1 que representa aproximadamente 24000 genes del genoma de *Arabidopsis* (Redman *et al.*, 2004). Después de la normalización de los datos encontramos que una pequeña fracción de los genes variaban muy poco su expresión en las tres réplicas biológicas indicando una reproducibilidad de los experimentos alta.

4.10 CULTIVOS DE CÉLULAS SINCRONIZADAS

Las células de *Arabidopsis* (MMD2) se sincronizaron en la fase G0 mediante cultivos con déficit de sacarosa (Menges y Murray, 2002), y su posterior re-adición al medio, contándose este punto como tiempo cero (tpo=0). Posteriormente se tomaron muestras del cultivo a distintos tiempos de los que se extrae el ARN. Este ARN se analizó mediante RT-PCR usando marcadores de ciclo celular como son la *HISTONA H4* (marcador de la fase S) y la *CICLINA B1;1* (marcador de la fase G2/M).

4.11 CITOMETRÍA DE FLUJO

Las muestras se prepararon a partir del material vegetal, eliminando el nervio principal y procesándolas según el protocolo de Galbraith *et al.*, 1988. Los extractos se filtraron con filtros de 60 y 40 µm. La tinción de los núcleos aislados se realizó con 50 µg/ml de yoduro de propidio (SIGMA) durante 45 minutos. Los histogramas se generaron gracias a un citómetro de flujo FACScalibur (BIOSCIENCE).

4.12 MATERIAL VEGETAL Y TRANGÉNICAS

En este trabajo hemos usado el siguiente material vegetal: Control o silvestre (Ecotipos: *Columbia*, *Landsberg erecta*, *wassilewskija*), *tir1-1* (Ruegger *et al.*, 1998) *skp2b* (Ren *et al.*, 2008) *axr1-12* (Hobbie and Estelle, 1995), *slr1* (Fukaki *et al.*, 2002), *ibr5-1*, Monroe-Augustus *et al.*, 2003), *iaa28* (Rogg *et al.*, 2001), *fas1-4* (Ramirez-Parra *et al.*, 2007a) y *fas2-1* (Serrano-Cartagena *et al.*, 1999), *pkl1* (Ogas *et al.*, 1999), *tmo7* (Schlereth *et al.*, 2010). Además, en este trabajo hemos caracterizado dos mutantes: *rap2.3* (GK-734E09.01) and *fez-3* (SALK_048924; Moreno_Risueño *et al.*, 2010). Estas plantas se crecieron en condiciones de esterilidad en placas de MS en posición vertical (Sales MS, 1% de sacarosa, y 1% de agar de plantas) a 22°C con 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

Para las construcciones del promotor de SKP2B con el reportador GUS se amplificaron por PCR los fragmentos del promotor 1.7Kb, 1Kb, 0.5Kb, 0.41Kb, 0.3Kb y se clonaron por BP en el vector pDONR221 (Invitrogen). Posteriormente se pasaron por LR al vector pGWB3 (Invitrogen). La construcción del promotor completo del gen SKP2B se utilizó para transformar los ecotipos *Columbia*, *Landsberg erecta*, *wassilewskija*. En el caso de la construcción de 1Kb con la mutación puntual se utilizó la construcción pDONR221 con 1Kb y un kit de mutagénesis puntual “Quick Change Multi Site Directed Mutagenesis kit” (Stratagene). Posteriormente se puso una LR con el vector pGWB3. Para analizar si el motivo de raíz identificado en la posición -393 a -409 (Tabla 2) es suficiente para conducir la expresión en raíces se fusionaron tres repeticiones de este motivo a un promotor mínimo 35S (Tucker *et al.*, 2002). Para generar las plantas transgénicas que expresaran diferentes ADNcs bajo el promotor 0.5KbSKP2B se adaptó el vector pGWB18 reemplazando el promotor 35S por el fragmento del promotor de SKP2B. Para las plantas que sobreexpresoras inducibles por estradiol se clonó en ADNc en el vector pDONR221 y posteriormente se puso una LR con el vector pER8 (Zuo *et al.*, 2000). Las plantas transgénicas se generaron según lo descrito en (del Pozo

et al., 2002) y se seleccionaron para la resistencia a antibiótico correspondiente. Se analizaron 30 líneas independientes y todas mostraron el mismo patrón de comportamiento. Las plantas transgénicas de CYCB1-GUS se generaron por la fusión del promotor de *CYCB1;1*, al fragmento amino terminal de la CYCB1, que contiene el motivo de degradación de la proteína, al gen reportero *uidA* (Colón-Carmona *et al.*, 1999). Estas líneas CYCB1-GUS, que sólo se detectan en células en fase G2/M, se cruzaron con el mutante *skp2b*. Para la determinación de enriquecimiento de H3.1/H3.3 se generaron plantas transgénicas con el promotor y la región codificante de H3.1 (At3g27360) y H3.3 (At4g40030) fusionadas al epitopo MYC (Ramírez-Parra *et al.*, sin publicar) utilizando el vector pGWB16 (Nakagawa *et al.*, 2007).

4.13 TINCIÓN HISTOQUÍMICA GUS

Se crecieron semillas de la generación T2 en placas Petri verticales, y se tiñeron usando un tampón GUS: 5 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7.0, 40 nM K₄Fe(CN)₆, 40 nM K₃Fe(CN)₆, 0,004% de tritón X-100 y 5 µg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indol-β-glucurónico (X-Gluc). La reacción se detiene con etanol al 70%. Las muestras se conservan en PBS 1x con glicerol 50% y 20% de etanol.

4.14 ENSAYO UNIÓN AUXINA

Para analizar la unión de las proteínas SKP2A y SKP2B a las auxinas, utilizamos proteínas recombinantes expresadas en bacterias. Las proteínas MBP-SKP2A, MBP-SKP2B y vector vacío (MBP) (NEW ENGLAND BIOLABS) se expresaron en células de la cepa BL21 Rosetta de *E.coli*. Para analizar la cantidad de proteína unida a bolas de maltosa hervimos 20 µl de cada muestra con LB/8ME a 100°C durante 4 minutos y se separaron en un gel de proteínas PAGE-SDS. Las proteínas se tiñeron con *Coomasie-blue*, lo que permitió su cuantificación relativa y el análisis de su calidad.

El mutante puntual de SKP2B (S128L) se generó gracias al sistema de STRATAGENE QuickChange Multi Site Directed Mutagenesis Kit. Tras la mutagénesis, los clones resultantes se secuenciaron para descartar otro tipo de mutaciones no deseadas. Todos los clones fueron transferidos mediante el sistema Gateway al vector MBP por recombinación LR. Finalmente las construcciones se expresaron como proteínas recombinantes en *Escherichia coli* y se purificaron mediante bolas de amilosa, según el protocolo descrito anteriormente.

Para los ensayos de unión a auxina se añadieron cantidades similares de cada una de las proteínas (unidas a bolas MBP) en 500 µl de PBS-Tween 20 0,1% con una concentración constante de 50 nM IAA-H3 con actividad específica 20 mCi/mmol. Esta mezcla se incubó durante 1h a temperatura ambiente. Tras realizar 3 lavados de 3 minutos, se adicionó a cada muestra 100 □ de líquido de centelleo y se midió la cantidad de radiactividad retenida por las distintas proteínas en un contador de centelleo líquido (PERKIN ELMER MicroBeta TriLUX 1450 LSC) mediante desintegraciones por minuto (d.p.m.). Los valores representados corresponden a la media de de tres repeticiones independientes.

4.15 UBIQUITINACIÓN *IN VITRO*.

Las reacciones de ubiquitinación *in vitro* se realizaron en 20 µl con buffer de ubiquitinación (25mM TRIS, 3mM ATP, 0.2mM DTT, 5mM MgCl₂, 0,05 µgr ubiquitina biotinilada) y se añadieron enzima E1, enzima E2 His-UBC11 y 2µl de MBP-XBAT32 expresada en bacteria (100ngr/µl) y purificada con bolas de amilosa. Como control se utilizó MBP (100ngr/µl) expresada en bacteria y purificada con bolas de amilosa. Se incubó durante 30 minutos a 30°C. Se calentaron las muestras con Laemmli buffer 10 minutos a 100°C. Se cargó en gel 10% acrilamida y se transfirió a un membrana de PVDF. Posteriormente se secó la membrana con metanol y se incubó con estreptavidina conjugada a peroxidasa (1/50000) en 2.5% de BSA durante 1

hora. Posteriormente se lavó la membrana tres veces con PBS-Tween20 durante 10 minutos y dos veces con PBS. Después de los lavados se incubó con el kit ECL plus.

4.17 UBIQUITINACIÓN DIANAS XBAT32

Las reacciones de ubiquitinación *in vitro* se realizaron en 50 µl con buffer de ubiquitinación (25mM TRIS, 3mM ATP, 0.2mM DTT, 5mM MgCl₂, 0,05 µgr ubiquitina biotinilada) y se añadieron enzima E1, enzima E2 His-UBC11 y 2µl de MBP-XBAT32 expresada en bacteria (100ngr/µl) y purificada con bolas de amilosa. Las proteínas diana fusionadas a GST se expresaron en bacteria y se utilizó el extracto crudo para la incubación con E1, E2 y XBAT32. Se incubó la reacción durante 1 hora a 30°C. Después se incubó la reacción con bolas GST para purificar las dianas. Posteriormente se calentaron las bolas GST con las dianas unidas en Laemmli buffer a 100°C durante 10 minutos. Se separó en un gel al 10% acrilamida y se transfirió a un membrana de PVDF. Posteriormente se secó la membrana con metanol y se incubó con estreptavidina conjugada a peroxidasa (1/50000) en 2.5% de BSA durante 1 hora. Posteriormente se lavó la membrana tres veces con PBS-Tween20 durante 10 minutos y dos veces con PBS. Después de los lavados se incubó con el kit ECL plus.

RESULTADOS

RESULTADOS

5.1. Función de *SKP2B*

5.1.1 Regulación de *SKP2B* a lo largo del ciclo celular

El gen *SKP2B* se describió por primera vez como un homólogo en *Arabidopsis* de la proteína de ciclo celular en humanos Skp2 (Del Pozo *et al.*, 2002). Posteriormente, se ha visto su implicación, junto con la E3, *RKP* en la degradación de KRP1 (Ren *et al.*, 2008). Para entender mejor el papel de *SKP2B* lo primero que nos planteamos fue analizar el patrón de expresión de *SKP2B* durante el ciclo celular y el desarrollo. Para ello se llevó a cabo un experimento de sincronización del ciclo celular en ausencia de sacarosa en células en cultivo de *Arabidopsis* MMD2 (Fig. 9). Después de adicionar sacarosa al medio se tomaron muestras cada dos horas durante un periodo de 20 horas, por lo que se consiguió analizar prácticamente un ciclo celular completo. Para poder seguir la progresión del ciclo celular se usaron dos marcadores la *HISTONA H4*, que sirvió de control de la fase S, y el gen de la *CYCLINA B1;1* como control de la fase G2/M. En la figura 9 se observa cómo la fase S se extiende desde la hora 6 a la 10 (existiendo un pico de expresión de la *HISTONA H4* a las 8 horas) y a partir de la hora 12 se aumenta la expresión de la *CYCLINA B1;1*, hasta la hora 16. La expresión de *SKP2B* se regula a lo largo del ciclo de división celular, observándose picos de aumento de expresión tanto en fase S como en G2/M (8 y 14 horas), siendo el pico en G2/M el de mayor expresión.

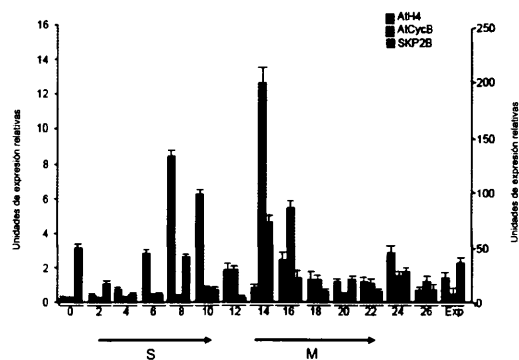


Figura 9. La expresión de *SKP2B* se regula a lo largo del ciclo celular. Para analizar la expresión de *SKP2B* a lo largo del ciclo celular se analizó su expresión por RT-PCR cuantitativa usando RNA procedente de células sincronizadas con sacarosa. *SKP2B* muestra un pico de expresión en las fases S y G2/M coincidiendo con la expresión de la histona *H4* y la *CYCBI;1* respectivamente.

5.1.2 SKP2B es una proteína nuclear

Para determinar la localización de la proteína SKP2B se realizó una fusión de esta proteína a la proteína GFP. Esta quimera y el control GFP se expresaron en plantas bajo el control del promotor constitutivo del virus del mosaico de la coliflor (35S:GFP; 35S:SKP2B-GFP). Mediante microscopía confocal, se analizaron los meristemos apicales de las raíces de plántulas que expresaban SKP2B-GFP, y el control GFP. La proteína GFP se localizó tanto en el núcleo como en el citoplasma (Fig. 10A), mientras la localización de SKP2B-GFP fue mayoritaria en los núcleos de las células en división (Fig. 10B). Estos datos indican que muy probablemente la función de la proteína SKP2B se esté llevando a cabo dentro del núcleo.

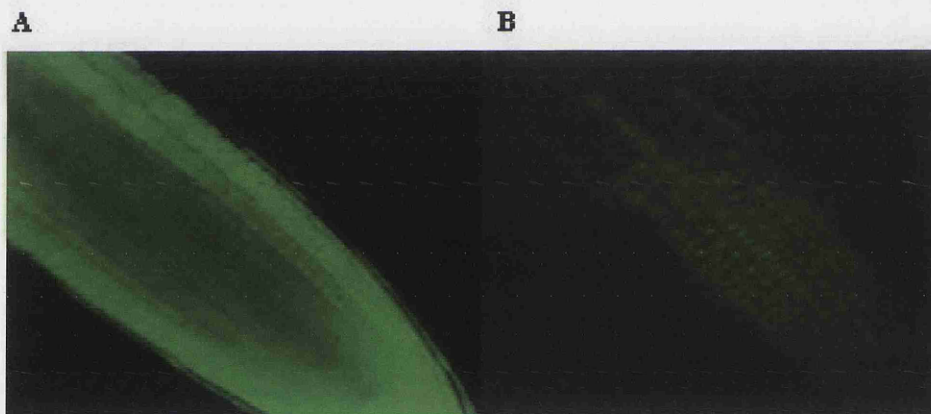


Figura 10. Localización celular de la proteína SKP2B. A. Expresión 35S:GFP. B. Expresión 35S:SKP2B-GFP.

5.1.3 Análisis del complejo SCF^{SKP2B}

Los complejos SCF están formados por cuatro subunidades: CUL1, ASK, RBX y proteínas de tipo F-box. En *Arabidopsis*, la familia ASK está compuesta por 21 miembros. Para analizar la interacción de SKP2B con miembros de diferentes subgrupos de esta familia se usó la técnica de doble híbrido. Así, se analizaron las interacciones de SKP2B con ASK1, ASK2, ASK6, ASK8, ASK10, ASK14 y ASK18.

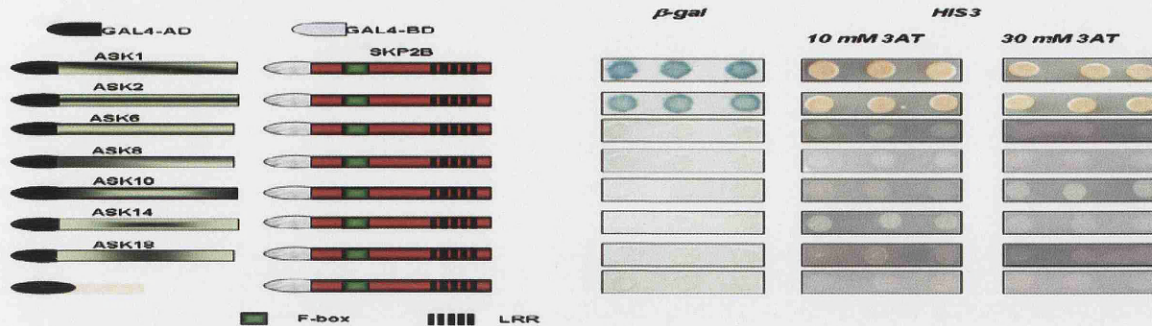


Figura 11. Interacción por el sistema de doble híbrido de levaduras de la proteína SKP2B con ASK1 y ASK2.

Los resultados de este ensayo mostraron que SKP2B interaccionaba preferentemente con ASK1 y ASK2 (Fig. 11). No se detectó interacción con el resto de los ASK analizados. Sin embargo, debido a las posibles limitaciones de la técnica, en estos casos negativos, no se puede descartar que *in vivo* si pudieran interaccionar con otras proteínas de la familia ASK.

5.1.4 Unión de SKP2B a auxina

Además del gen *SKP2B*, se ha descrito en *Arabidopsis*, el gen *SKP2A*, como otro homólogo al gen *Skp2* de humanos. La proteína SKP2A tiene un 83% de homología con la proteína SKP2B. La proteína SKP2A es capaz de unir directamente auxina en ensayos *in vitro* (Jurado *et al.*, 2010). En este trabajo, se utilizó tanto la proteína SKP2A como SKP2B para analizar la unión a auxina y se demostró que solo SKP2A era capaz de unir esta hormona. De los residuos importantes para la unión a auxina, SKP2A y SKP2B solo difieren en el residuo en la posición 128, que en SKP2A es una Leucina y en SKP2B una Serina. Para analizar si cambiando en la proteína SKP2B el residuo 128 de Serina por Leucina aumentaba la capacidad de unión de SKP2B a auxina se generaron 2 proteínas de fusión a la MBP (Maltosa Binding Protein), la proteína SKP2B silvestre y la mutante SKP2B (S128L). Las proteínas recombinantes se expresaron en bacteria y se purificaron uniéndolas a bolas de amilosa. Las proteínas unidas a bolas se utilizaron para ensayos de unión a auxina marcada radiactivamente. Como control positivo se utilizó la proteína de fusión MBP-SKP2A y como control

negativo la MBP. Las cuatro muestras se incubaron durante 1 hora y se lavaron 3 veces durante 3 minutos con PBS-Tween 0,1%. La cantidad de auxina radiactiva unida a las proteínas recombinantes se midió en un contador de centelleo, que cuenta las desintegraciones por minuto (d.p.m.). En la figura 12 se muestran los valores de unión de SKP2B y SKP2B (S128L) normalizados a los valores de la cantidad de auxina retenida por la proteína SKP2A. La cantidad de auxina retenida por la proteína mutada SKP2B (S128L) es significativamente mayor en comparación con los valores retenidos por la proteína silvestre SKP2B.

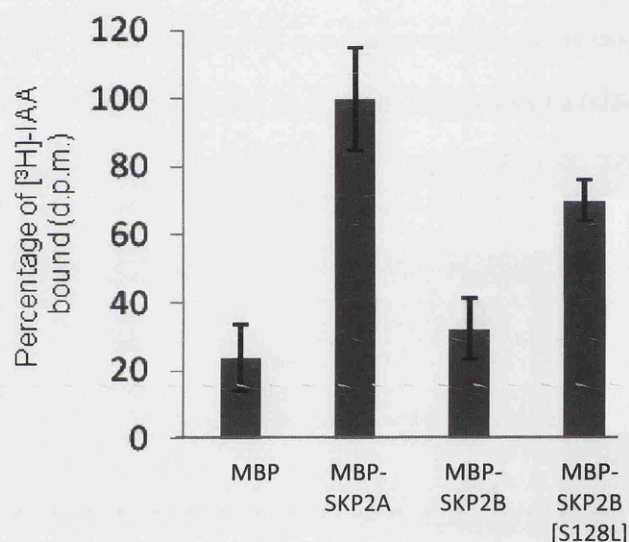


Figura 12. Unión de *SKP2B* a auxina. Las proteínas recombinantes MBP, MBP-SKP2A, MBP-SKP2B y la mutante MBP-SKP2B(S128L) en la que se ha cambiado la Serina en posición 128 por una Leucina se incubaron en presencia de 50 nM [3H]-IAA. Se midió en un contador de centelleo la auxina radioactiva, [3H]-IAA, retenida en las bolas de amilosa después de tres lavados. Cada valor es la media de tres medidas independientes y las barras de error corresponden a desviaciones estándar. Los resultados se normalizaron con las medidas de la auxina retenida en las bolas de MBP-SKP2A y se presentan en porcentaje.

5.1.5 *SKP2B* se expresa en estadios tempranos de formación de *RL*

Para estudiar en detalle la expresión de *SKP2B* se clonó la región promotora del gen *SKP2B* (1.7Kb) y se fusionó al gen reportador GUS (*SKP2B*:GUS). Se analizaron diferentes líneas transgénicas para la tinción GUS mostrando todas las líneas analizadas un mismo patrón de expresión. Se analizó el patrón de expresión espacio-temporal por análisis histoquímicos de las diferentes líneas transgénicas. La figura 13 muestra

plantas *SKP2B*:GUS teñidas para GUS a diferentes estadios de desarrollo. Como podemos observar *SKP2B* se expresa principalmente en células en división del meristemo apical (Fig. 13B), de flores y silicuas (Fig. 13D) y en el tejido vascular de las hojas (Fig. 13C). En este trabajo nos hemos centrado principalmente en la expresión de *SKP2B* en la raíz donde se expresa en el meristemo principal (Fig. 13T y 13U), en el meristemo basal (Fig. 13T) y en los “Puntos de Iniciación de formación de Raíces Laterales” (PIRL) a lo largo de toda la raíz principal (Fig. 13F a 13S). Como se muestra en la figura 13E, en un corte transversal de la raíz, *SKP2B* se expresa de forma específica en las células del periciclo. Además, *SKP2B* se está expresando de forma muy temprana en el desarrollo del primordio de RL, incluso antes de que tenga lugar la primera división celular asimétrica de las células fundadoras (Fig. 13F). La expresión de *SKP2B* tiene lugar en todos los estadios de formación del primordio (Fig. 13I-13R), además a partir del estadio III encontramos expresión de *SKP2B* en las células del córtex y la epidermis que bordean al primordio (Fig. 13K a 13S). Estos resultados nos permiten definir la expresión de *SKP2B* como un marcador temprano de la especificación de las células fundadoras del periciclo en la raíz y del desarrollo de las raíces laterales.

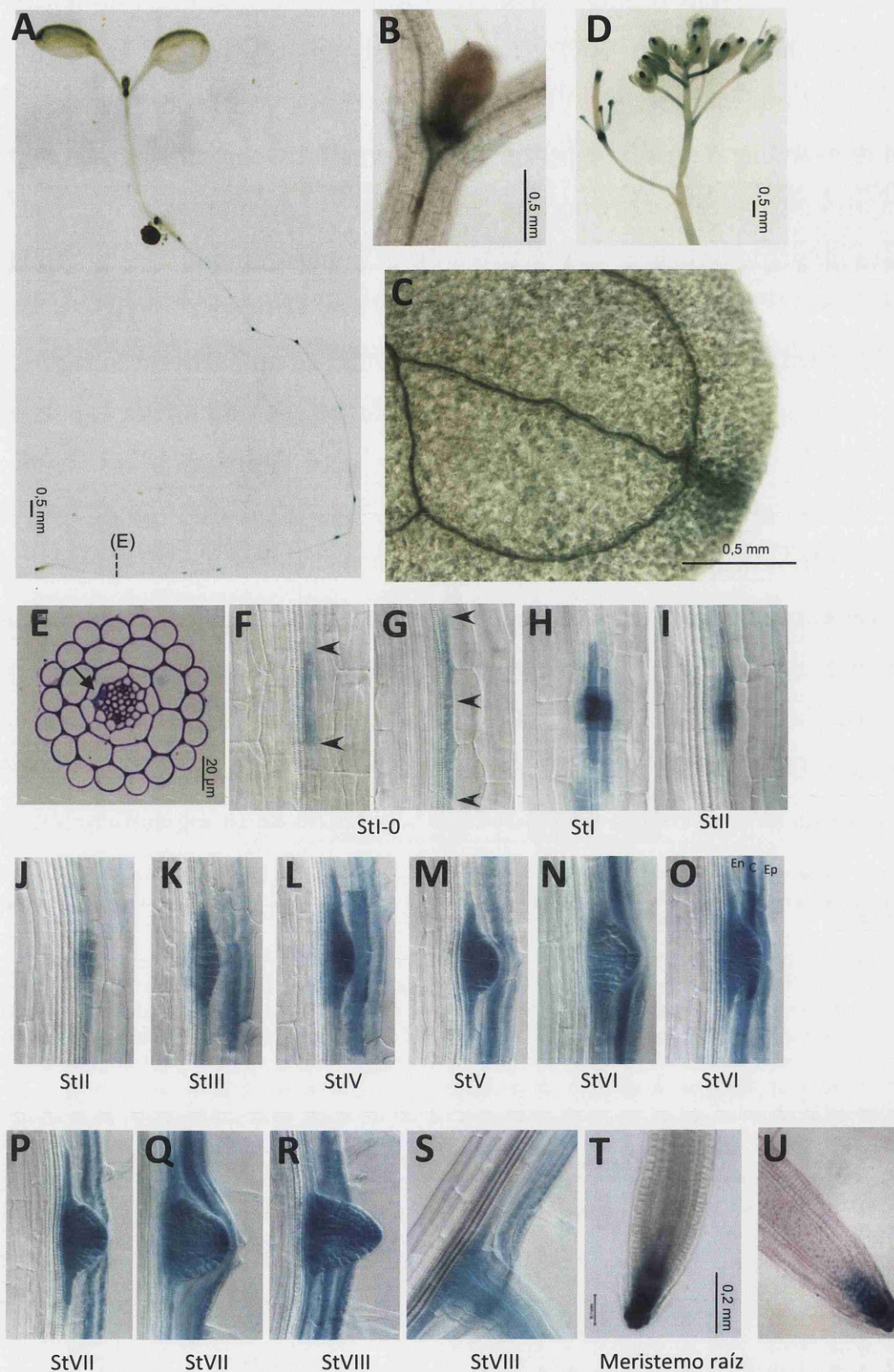


Figura 13. *Expresión de SKP2B.* A) Plantas *SKP2B*:GUS crecidas durante 7 días y teñidas para actividad GUS. La barra indica la zona donde se hizo la sección que se muestra en la foto E. B) Expresión de *SKP2B* en la parte aérea. C) Cotiledón y tejido vascular. D) Flores. E) Sección transversal del primer PRL teñido para GUS como se muestra en la figura A. La flecha indica las células del periciclo teñidas para actividad GUS. F-S) Formación de primordios de RL a diferentes estadios de desarrollo del estadio 0 al estadio VIII. T) Meristemo de raíz. Barras: A-C 0,5 mm; E, 20 μm; F-T, 0,2 mm.

5.1.6 Análisis del mutante *skp2b* en el desarrollo del sistema radicular.

Como se ha mostrado en la figura 13, *SKP2B* se expresa en etapas tempranas del desarrollo de RL, incluso previo a la primera división de las células del periciclo que darán lugar al primordio. Esto nos ha sugerido que *SKP2B* podría estar implicado en el control de la división de las células fundadoras. Por ello, para determinar la función de *SKP2B* durante el desarrollo del sistema radicular analizamos si el mutante *skp2b* (Ren *et al.*, 2008) tenía alguna alteración en el proceso de formación de RL. Para ello se crecieron plantas mutantes *skp2b* y plantas silvestres en medio MS durante 8 días. Posteriormente se analizaron tanto el tamaño de la raíz principal como el número de RL por mm además del número de primordios en cada estadio. Se observó que las raíces del mutante *skp2b* son significativamente más grandes que las del silvestre (Fig. 14A). El número de primordios de RL por mm de raíz en el mutante es mayor que en el silvestre (Fig. 14B). Además, cuando observamos el número de primordios en los distintos estadios vemos que en el mutante *skp2b* se inician más RLs comparado con el silvestre (Fig. 14C). También podemos observar que la densidad de PRL en los primeros estadios del desarrollo (StI y II) es significativamente mayor que en las raíces del silvestre (Fig. 14C). No obstante, los resultados sugieren que algunos de estos primordios que se desarrollan en el mutante quedan bloqueados, ya que no se observan más RLs emergidas (StVIII) que en el silvestre. Es decir, no todos los PRL que se inician emergen, al menos en raíces de 8 días.

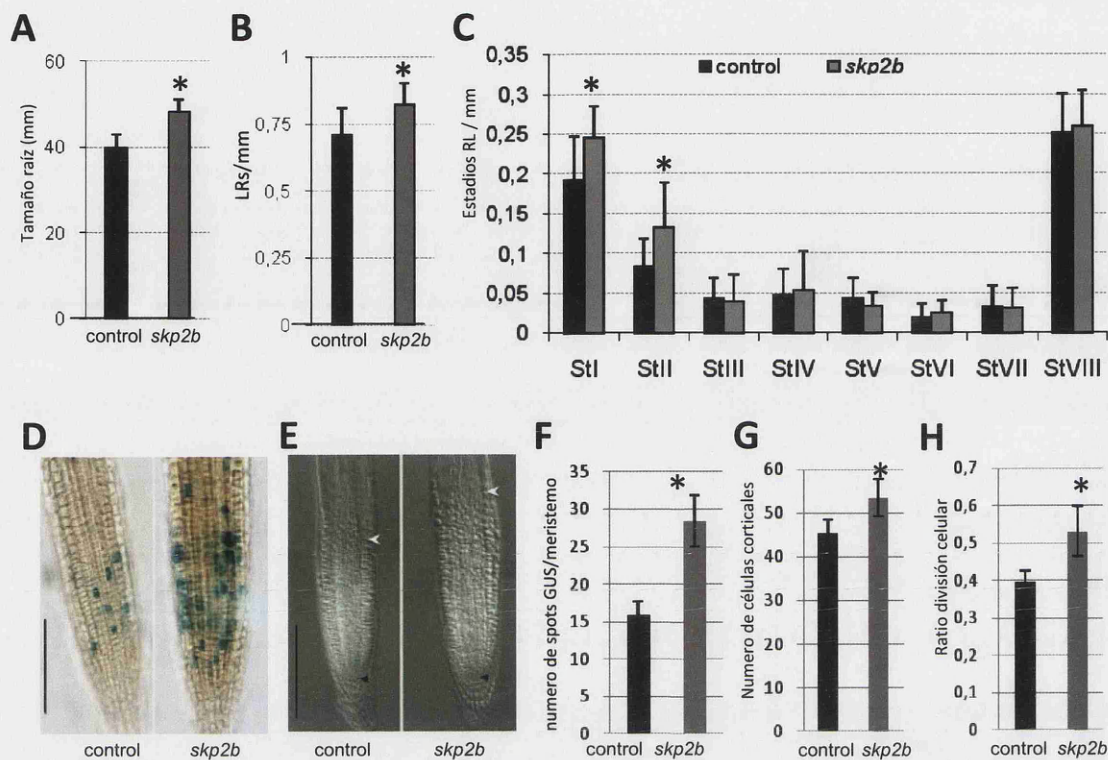


Figura 14. *SKP2B* reprime división celular. Plantas control (Col-0) y el mutante *skp2b* se crecieron durante 8 días en medio MS en placas verticales. A) Tamaño raíz. B) Número total de RL incluyendo RL y primordios por milímetro. C) Número de primordios de RL en diferentes estadios por milímetro. D) Tinción histoquímica para expresión GUS de plantas *CYCB1;1:GUS* (control) y *CYCB1;1:GUS/skp2b* (*skp2b*). E) Meristemo principal de raíz en plantas control y *skp2b*. Las flechas negras indican la posición del centro quiescente y las blancas indican el final del meristemo de la raíz. F) Cuantificación de los spots de *CYCB1;1:GUS* por meristemo en raíces control y en el mutante *skp2b*, n = 30. G) Número de células meristemáticas del cortex en plantas control y *skp2b*. H) Cuantificación tanto del ratio de división celular como del número de spot de GUS por célula meristemática del cortex en plantas control y *skp2b*. *Diferencias estadísticamente significativas medidas por Student's t-test ($P < 0,0001$); En todas las fotos la barra de error corresponde a 200 μ m.

Estos resultados sugieren que *SKP2B* es un regulador negativo de la formación de RL, reprimiendo la activación de las células fundadoras. También quisimos analizar si la mutación en *SKP2B* afectaba a la división en el meristemo principal. Para ello, analizamos la expresión del marcador de ciclo celular *CYCB1;1:GUS* un marcador de células en estadio G2/M. Como se muestra en la figura 14D-F, en el mutante *skp2b* hay un mayor número de células en esta fase (Fig. 14D y 14F). Además medimos el tamaño del meristemo y comprobamos que el meristemo de *skp2b* tiene tanto un meristemo de mayor tamaño que el de plantas silvestres como un mayor ratio de división celular (Fig. 14E, 14G y 14H).

5.1.7 Análisis del doble mutante *skp2brkp* en el desarrollo del sistema radicular

Anteriormente se había descrito el papel de *SKP2B* en colaboración con la E3 de tipo RING RKP en la degradación del inhibidor del ciclo celular KRP1 (Ren *et al.*, 2008). Ya que habíamos visto que *SKP2B* regula la formación de RL decidimos investigar el papel del gen *RKP* en el desarrollo de RL. Para ello, cuantificamos tanto el tamaño de la raíz principal como el número de RL en mutante *rkp* y en el doble mutante *skp2brkp*. Observamos que tanto el mutante *rkp* como el doble mutante *skp2brkp* desarrollan raíces de mayor tamaño (Fig. 15A). Sin embargo, observamos que el mutante *rkp* tiene un efecto poco significativo en la formación de RL (Fig. 15B), aunque encontramos un número significativamente mayor de RL emergidas en el doble mutante *skp2brkp* (St VIII) (Fig. 15C) por lo que podemos pensar que en el mutante *rkp* se estimula la emergencia de los primordios que se forman en mayor medida en el mutante *skp2b* con respecto al silvestre.

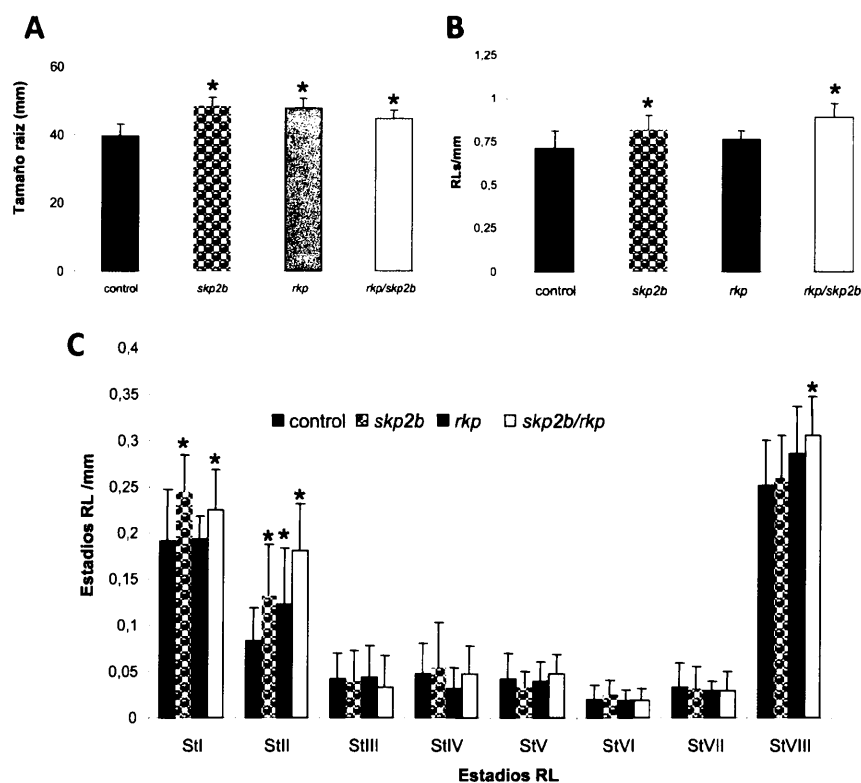


Figura 15. El doble mutante *rkpskp2b* desarrolla un mayor número de RL emergidas. Se crecieron durante 8 días plantas control, el mutante *skp2b* y el doble mutante *skp2brkp* en placas verticales con medio MS. A) Tamaño de la raíz. B) Número total de RL (incluyendo RL y primordios por milímetro). C) Número de primordios de RL en diferentes estadios por milímetro.

5.2. *SKP2B* como un marcador de las células fundadoras de RL.

5.2.1 Identificación de un nuevo motivo específico de raíz

Uno de los objetivos de este trabajo ha sido identificar la región genómica mínima necesaria y suficiente responsable de la expresión del gen *SKP2B* en los PIRL. Para ello hemos generado varias construcciones con diferentes fragmentos del promotor de *SKP2B* fusionados al gen reportador GUS. Hemos generado líneas transgénicas que contienen estas construcciones y se ha analizado la expresión mediante tinción histoquímica (Fig. 16A). La expresión del promotor de 1Kb (1Kb*SKP2B*:GUS) por encima del ATG muestra el mismo patrón de expresión que el promotor completo. Sin embargo, cuando analizamos la expresión del promotor de 500pb (0.5Kb*SKP2B*:GUS) encontramos expresión solo en la células fundadoras y primordios de RL perdiendo la expresión en el meristemo principal, en las células del córtex y la epidermis que rodean al primordio (Fig. 16B). Al analizar el patrón de expresión en plantas con un fragmento de 300pb del promotor (0.3Kb*SKP2B*:GUS) no observamos tinción para GUS, mientras que plantas con la construcción de 410pb del promotor mostraron un patrón de expresión similar al descrito para plantas 0.5Kb*SKP2B*:GUS. Este resultado sugiere que el elemento que regula la expresión de *SKP2B* en los PIRL se encuentra localizado en la región -410pb a -300pb. Para identificar motivos en *cis* en esta región procedimos a analizar esta secuencia con programa PLACE (PLACE: <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/index.html>). En este análisis encontramos un motivo específico de raíz en la región comprendida entre los nucleótidos -386pb a la región -410pb del promotor (Tabla 2). Para comprobar la relevancia de este motivo en la expresión de *SKP2B* realizamos una mutagénesis puntual de la citosina en posición -397, que se encuentra conservada en distintas especies, por una adenina (Tabla 2). Fusionamos un fragmento de 1Kb del promotor de *SKP2B* que contenía esta mutación puntual al gen reportador GUS y generamos plantas transgénicas 1Kb*SKP2Bmut*:GUS. Análisis histoquímicos revelaron que

esta mutación suprime la expresión de *SKP2B* en los PIRL pero no en el meristemo principal (Fig. 16C y 16D), indicando que este motivo es importante para la expresión de *SKP2B* en los primordios de RL. Para analizar si este motivo era suficiente para dirigir la expresión de *SKP2B* en las células fundadoras se fusionaron 3 copias de este motivo a un promotor mínimo 35S (-50) y se generaron plantas transgénicas. Ninguna de las 30 líneas analizadas mostró expresión GUS indicando que esta región es necesaria pero no suficiente para la expresión de *SKP2B* en las células fundadoras y en los PIRL (datos no mostrados). Por tanto, estos resultados indicaban que en el fragmento comprendido entre los nucleótidos -300 y -410 es donde posiblemente se localiza el motivo responsable de la expresión del gen *SKP2B* en los PIRL.

Secuencia promotora de *SKP2B*:

AAGCTTTAAAAAATTAACGGATTAGTAATAATTCAACCGAAGCCGAAGAACACGATTTTCAGAGGTATGATCCG
GAAAAAAAATCCAAAGTTTGGATCCTTTTGTGTTTTTGGTGAGCAAAAAA
AGTAATTTCTCCAACTTTCTGGAAAAAT
CCATCCAGCAAAAAGAAAAGAATAATTGGTTTTATTGATCAAAGATCTTCAGTTTTCAAAATTAAGCACTAATTA
TGGGGTTTTGTTTATTAATGTCCTAAAAAGAGTTACACATAGAGAGACATTAATGCTTGCAGTTTAGTTTAAA
GAGTTTTAAGACCATATCTCACTCAATCCTTATTTCTTACATTTGTCGTCCTTTTGATGTCATAGACTCAGAGAT
ATTTATTTATCTTCTTCTCTCATTTCTCATTTCTCATATTTACTTTTGATCTCGTGGTGTAGAATCAAAGAA
ACCGTTCAAGGATG

<i>SKP2B</i>	CTGGTCCTACGCTAGTCAATGG	Este trabajo		<i>Arabidopsis thaliana</i>
RSEPVGRP18	CATCCAACCTTTTCATATCCATGTGCTT	Plant Mol Biol 26: 747-756 (1994) PubMed: 7948928	62,5	<i>Glycine max</i>
Cis accession No: S000289	<i>SKP2B</i> CCATTGACTAGCGTAGGACCAG ::: ::: : : RSEPVG CATCCAACCTTTTCATATCCATGTGCTT			
RSRBNEXTA	CAAACCTCGTATATCCAT	Plant Mol Biol 37:675-687 (1998) PubMed: 9687071	58,3	<i>Brassica napus</i>
Cis accession No: S000243	<i>SKP2B</i> CCATTGACTAGCGTAGGACCAG ::: : : : RSRBNE CAAACCTCGTATATCCAT			
RSEPVGRP1	CAAACCTCGTATATCCAT	Transgenic Res 4:388-396 (1995) PubMed: 7581519	74	<i>Phaseolus vulgaris</i>
Cis accession No: S000099	<i>SKP2B</i> CCATTGACTAGCGTAGGACCAG ::: : : : RBCSBO ATCATTTTCACTCA			

Tabla 2. Identificación de un elemento específico de raíz en el promotor del gen *SKP2B* (Subrayado) que comparte homología con otros elementos específicos de raíz descritos en la literatura. Utilizando el programa PLACE procedimos a la búsqueda de elementos en promotores de plantas que compartieran homología con el dominio I (gris) que se identificó en el promotor del gen *SKP2B* como la región mínima que mantiene la expresión en los PIRL. Se señala en rojo la citosina mutada en el promotor de 1Kb de *SKP2B* que muestra una expresión reducida de *SKP2B* en los puntos de iniciación de RL (Figura 16).

A

Posición desde ATG		Tinción GUS	
Principio	Fin	MR	PIRL
- 1750	+9	+	+
-1000	+9	+	+
-560	+9	-	+
-500	+9	-	+
-464	+9	-	+
-408	+9	-	+
-340	+9	-	-

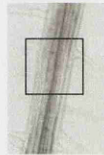
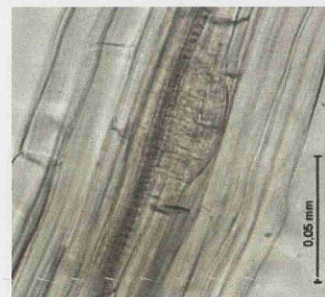
B0.5Kb-
SKP2B:GUS SKP2B:GUS**C**1Kb
SKP2B:GUS1Kbmut-
SKP2B:GUS**D**

Figura 16. La expresión de *SKP2B* en la raíz se puede separar en dos dominios. A) Representación de las diferentes regiones del promotor utilizadas para generar plantas transgénicas. Muestran expresión en el meristemo radicular, en los PIRL o en ambos. B) Raíces teñidas para GUS de plantas *SKP2B:GUS* y *0.5KbSKP2B:GUS* mostrando PIRL (panel superior) o meristemo radicular (panel inferior). C) Plantas *1KbSKP2B:GUS* y *1KbSKP2Bmut:GUS* teñidas para GUS mostrando PIRL (panel superior) o meristemo radicular (panel inferior). D) Aumento del cuadro señalado en el panel C mostrando un primordio sin teñir para GUS. Barras corresponden a 0.2 mm (A-C) y 0.05mm en D.

5.2.2 Expresión de la proteína silvestre IAA14 y la proteína mutante mIAA14 bajo el promotor de gen *SKP2B* 0.5Kb

Para comprobar el uso del promotor del gen *SKP2B* en la manipulación de la arquitectura de la raíz utilizamos el fragmento del promotor de 500pb para expresar el gen de la Barnasa (en las células fundadoras y primordios) que codifica para una ribonucleasa con efecto tóxico (Paddon y Hartley, 1986; Hartley, 1998). El análisis de estas plantas transgénicas reveló una reducción de más de un tercio del número de RL emergidas (Figura 17A). Utilizando el mismo procedimiento, expresamos bajo el promotor 0.5Kb*SKP2B* las proteínas silvestre IAA14 y mutante mIAA14 (una proteína con función dominante negativa) que bloquean la formación de RL (Fukaki *et al.*, 2002; Fukaki *et al.*, 2006). Como se muestra en las figuras 17B y 17C, la expresión de las proteínas IAA14 ó mIAA14 reducen significativamente el número de RL. Por lo que podemos concluir que la expresión de *SKP2B* es específica de las células fundadoras y los PIRL ya que la expresión ectópica de las proteínas silvestre IAA14 y mutante mIAA14 en estas células reduce el número de RL. Además, estos resultados muestran que el promotor de *SKP2B* se puede utilizar como herramienta biotecnológica para manipular el sistema radicular.

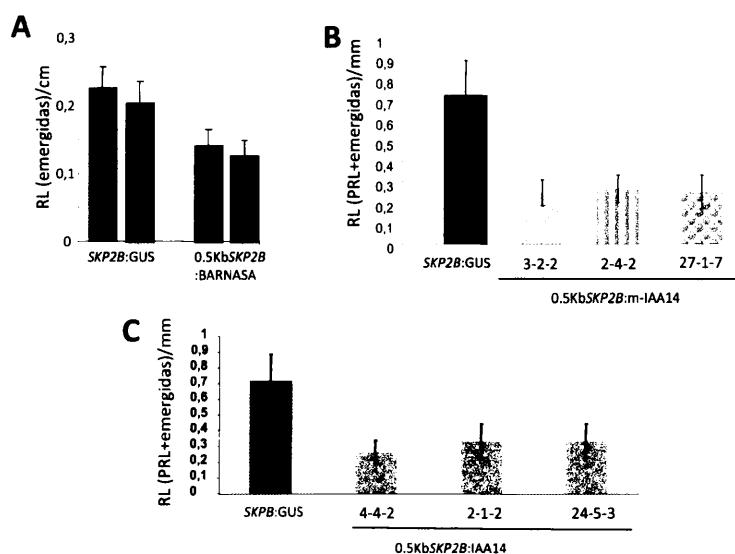


Figura 17. El dominio de expresión de 0.5Kb*SKP2B* es específico de los PIRL. A) Medidas de RL emergidas/cm de plantas *SKP2B:GUS* y 0.5Kb*SKP2B:BARNASA* crecidas durante 7 días. B) Medidas de RL (PRL+RL emergidas)/mm de plantas *SKP2B:GUS* y tres líneas transgénicas con la construcción 0.5Kb*SKP2B:mIAA14*. C) Medidas de RL (PRL+RL emergidas)/mm de plantas *SKP2B:GUS* y tres líneas transgénicas con la construcción 0.5Kb*SKP2B:IAA14*.

5.2.3 Papel de *SKP2B* en la respuesta a auxina

Para determinar la función de *SKP2B* en la respuesta a auxina se cruzó el mutante *skp2b* con el promotor sintético de respuesta a auxina *DR5:GUS*. Se ha descrito en algunos trabajos que la expresión del promotor *DR5* no se detecta en todos los primordios de RL dentro de una misma raíz (Benkova *et al.*, 2003; De Smet *et al.*, 2003). Cuando analizamos la expresión de *DR5* en el mutante *skp2b* observamos que casi todos los primordios expresan GUS (Fig. 18A), por lo que observamos un aumento del número de primordios con tinción en el mutante con respecto al silvestre. Para determinar si había diferencias de tinción GUS en la distribución de primordios en los distintos estadios de formación de primordios de RL (0-VIII) se comparó el patrón de tinción *DR5* en el mutante y la línea silvestre y se contaron tanto los primordios teñidos como los no teñidos en la línea *DR5:GUS* (Fig. 18B). Como podemos observar en el mutante *skp2b* encontramos un menor número de primordios del estadio III al VI sin expresión *DR5* en comparación con el silvestre (Fig. 18B). Estos resultados sugieren que en el fondo mutante *skp2b* se previene el arresto de los primordios que no progresarían normalmente en RL maduras. En el trabajo de Dubrovsky *et al.*, 2008, se ha descrito que el promotor *DR5* es un marcador temprano de la formación de primordios de RL y que la activación del promotor se correlaciona con el comienzo del desarrollo del primordio de RL. Sin embargo, estos autores proporcionaron evidencias que sugieren que la actividad del promotor *DR5* no refleja una elevada sensibilidad a la señalización mediada por auxina pero sí al incremento en los niveles de auxina en las células. Nuestros datos sugieren que en el mutante *skp2b* los primordios que quedarían parados, y por ello sin expresión para *DR5* en el silvestre, continúan desarrollándose en el mutante hacia RL.

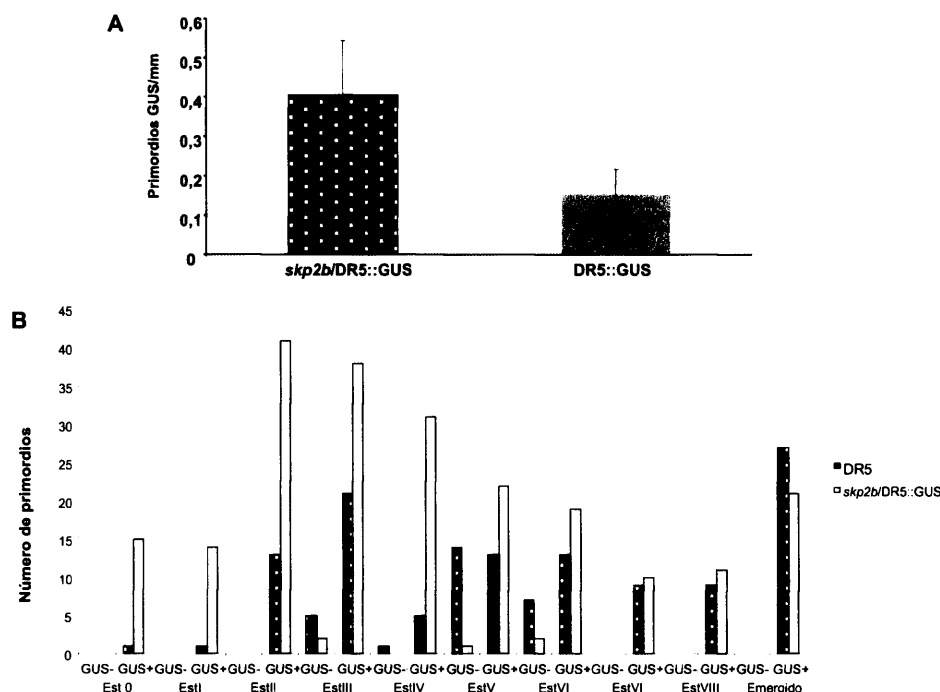


Figura 18. La respuesta a auxina está incrementada en el mutante *skip2b*. A) Medidas de PIRL (primordios teñidos para actividad GUS)/mm en la línea *DR5::GUS* y en *skip2b/DR5::GUS*. B) Número total de primordios (Teñidos y sin teñir para actividad GUS) en cada uno de los estadios de formación de PRL en la línea control *DR5::GUS* y en la línea *skip2b/DR5::GUS*.

5.3. Regulación de la expresión de *SKP2B*.

La determinación de la región mínima promotora de *SKP2B* (0.41Kb*SKP2B*) responsable de la expresión en los PIRL en la raíz nos llevo a la búsqueda de posibles reguladores transcripcionales. Para determinar los factores reguladores de la expresión de *SKP2B* utilizamos la técnica de “un híbrido” de levaduras. Para ello, se clonó el fragmento de 0.41Kb del promotor de *SKP2B* sobre el promotor mínimo del gen reportador *HIS3*. Esta construcción se introdujo en levaduras mediante integración en el genoma y posteriormente se transformó con una librería de cADNs de plantas de *Arabidopsis* de 5 días. Los transformantes se seleccionaron para el reportador *HIS3*. En una primera búsqueda en 2 millones de transformantes obtuvimos 60 clones. Agrupando los clones positivos por secuenciación de los productos de PCR encontramos que correspondían al gen *ATEBP/RAP2.3* (At3g16770), un factor de transcripción de la familia ERF (Ethylene Response Factor), al gen de la variante histónica *H3.3*

(At4g40040), al gen *TCP24* (At4g18390) y otro al gen *AMMECR1* (At2g38710). Posteriormente, realizamos un ensayo de crecimiento de estos clones en medio mínimo de levaduras con una mezcla completa de aminoácidos, sin histidina y con concentraciones crecientes del inhibidor de la síntesis de histidina, 3AT (3 amino triazol) (Fig. 19). Estos análisis mostraron que RAP2:3 y la variante histónica H3:3 eran capaces de promover el crecimiento de la levadura incluso a 20mM de 3AT, sugiriendo que podrían ser buenos candidatos para la regulación de la expresión de *SKP2B*.

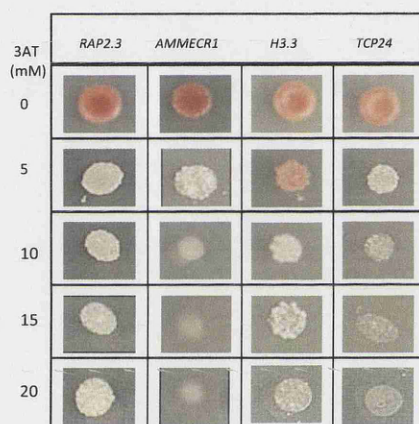


Figura 19. Identificación de proteínas que se unen al promotor 0.41Kb*SKP2B*. Se utilizó el promotor de 0.41Kb*SKP2B* para la búsqueda de posibles proteínas que interaccionaran con esta región promotora. Los clones positivos se crecieron de nuevo en medio sin histidina y con concentraciones crecientes de 3AT.

Después de analizar el crecimiento de estos clones en medio con el inhibidor 3AT decidimos estudiar en detalle el papel del factor de transcripción RAP2.3 y la histona H3.3 en el control de la expresión de *SKP2B*.

5.3.1 La expresión de *SKP2B* está regulada por el factor de transcripción RAP2.3.

Los factores de transcripción de tipo ERF se unen a motivos consenso tanto CCG, como a motivos DRE (Dehydration-Responsive Elements) (Yang *et al.*, 2009). En una primera aproximación para verificar la unión del factor

de transcripción RAP2.3 a la región promotora de *SKP2B* llevamos a cabo experimentos de unión de tipo EMSA (Fig. 20A). Para ello, hemos generado una sonda biotinilada del promotor *SKP2B* del mismo tamaño que el utilizado para los experimentos de un-híbrido y una proteína de fusión GST-RAP2.3 (Glutathione-S-Transferase). La proteína recombinante expresada en bacteria, se purificó con bolas de GST y se eluyó de las bolas con glutathione. Posteriormente, se incubaron sonda y proteína en buffer de unión y posteriormente se visualizó la unión proteína-ADN mediante western-blot usando Estreptavidina-HRP para la detección de la sonda. Como se observa en la figura 20A, la proteína GST-RAP2.3, pero no la GST, es capaz de retrasar la movilidad de la sonda 0.41Kb *SKP2B*. Asimismo, esta unión es capaz de ser competida por sonda sin marcar indicando que RAP2.3 se une específicamente al promotor de *SKP2B*.

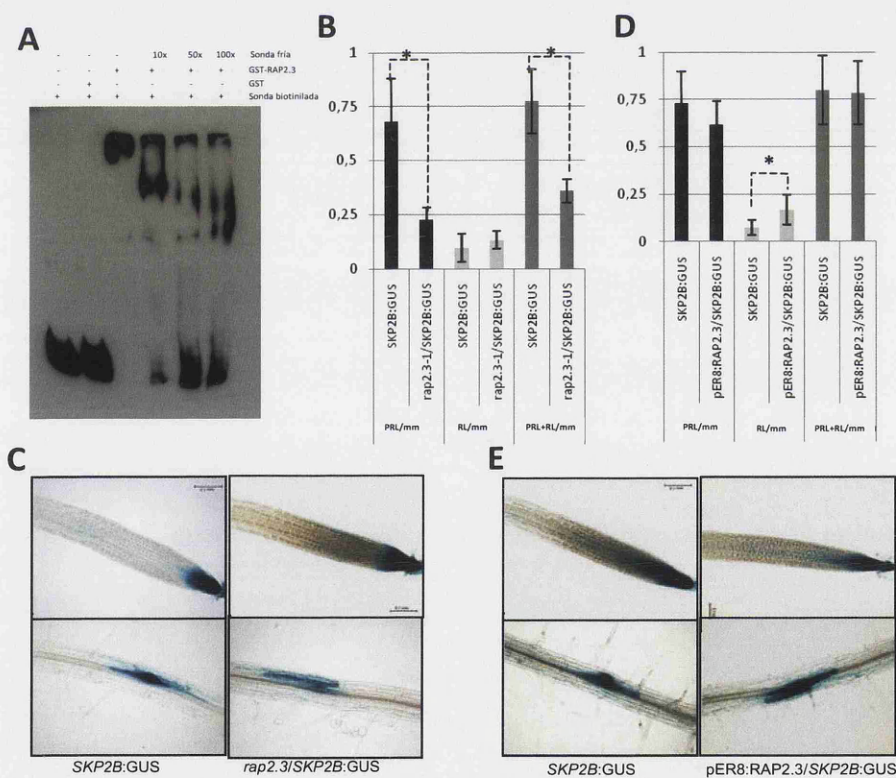


Figura 20. El factor de transcripción RAP2.3 regula la expresión de *SKP2B* in vivo. A) Ensayo de movilidad electroforética del promotor *SKP2B* unido a la proteína de fusión GST-RAP2.3. Se utilizaron concentraciones crecientes de sonda fría como competidor específico. B) Cuantificación del número de PIRL (contados como spots de expresión *SKP2B:GUS*) por mm de raíz en plantas *SKP2B:GUS*, o plantas *rap2.3/SKP2B:GUS* de 6 días. C) Tinción para GUS del meristemo de la raíz o de primordios de RL de plantas analizadas en A. D) Cuantificación del número de PIRL (contado como spots de expresión *SKP2B:GUS*) por mm de raíz en plantas *SKP2B:GUS*, o *pER8:RAP2.3/SKP2B:GUS* de 6 días y tratadas con estradiol 10 μ M durante 24 horas. E) Tinción para GUS del meristemo principal o de primordios de RL de plantas analizadas en C.

Además, para analizar la expresión de *SKP2B* en el mutante *rap2.3* cruzamos este mutante con la línea *SKP2B*:GUS. Crecimos plantas *rap2.3*/*SKP2B*:GUS durante 7 días y cuantificamos el número de primordios con tinción GUS. Observamos que el número de primordios en el mutante *rap2.3* es significativamente menor en comparación con plantas control, sin embargo el número de RL emergidas no se ve afectado (Fig. 20B). En el caso de la tinción GUS de plantas *rap2.3*/*SKP2B*:GUS encontramos que la intensidad de tinción es significativamente menor en los primordios del mutante *rap2.3*, mientras que la tinción en el meristemo basal de la raíz está ligeramente deslocalizada e incrementada en el meristemo apical en comparación con el control *SKP2B*:GUS (Fig. 20C). Para analizar el efecto de la sobreexpresión del gen *RAP2.3* en la expresión de *SKP2B* se generó una línea sobreexpresora inducible por estradiol pER8*RAP2.3*, que se cruzó con la línea *SKP2B*:GUS. Al analizar el número de primordios en plantas pER8*RAP2.3*/*SKP2B*:GUS tratadas con estradiol, no encontramos diferencias significativas, sin embargo, sí que observamos un mayor número de RL emergidas en la línea sobreexpresora (Fig. 20D). En el caso de la línea sobreexpresora no se encontraron diferencias significativas en términos de tinción GUS tanto en primordios como en el meristemo principal (Fig. 20E).

5.3.2 El intercambio de histonas mediado por CAF regula la expresión de *SKP2B*.

Como se comentó anteriormente, hemos encontrado por la técnica de un híbrido en levaduras que la histona H3.3 se une al promotor de 410pb del gen *SKP2B*. A diferencia de la histona H3.1 que se asocia principalmente a la replicación del DNA, la variante H3.3 se asocia preferentemente con un estado descondensado y de transcripción activa del ADN (Ahmad y Henikoff 2002) (Fig. 21). Con este resultado decidimos analizar si el promotor de *SKP2B* contiene la variante histónica H3.3 *in vivo*. Para ello iniciamos el mapeo de la presencia de las histonas H3.3 y H3.1 en el promotor del gen

SKP2B utilizando plantas transgénicas que expresan la histona H3.3 y H3.1 fusionadas al epítipo MYC bajo el control de su propio promotor (Ramírez-Parra y Gutiérrez, sin publicar). Ya que la auxina regula la iniciación y la formación de primordios de RL, decidimos analizar si había algún cambio en los niveles de H3.3/H3.1 en el promotor del gen *SKP2B* al tratar las plantas con o sin auxina durante 24 horas. Como control se amplificaron el gen vecino *PIN6* (At1g77110) y genes cuya transcripción se modifica por el tratamiento con auxina como son la *CYCB1;1* (At4g37490) y *GRP* (At4g30450) (Fig. 22C). Llevamos a cabo ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina “ChIP” usando el anticuerpo antiMYC y amplificación por PCR de fragmentos del promotor del gen *SKP2B* y de los genes control. Como se muestra en las figuras 22A y 22B, el promotor del gen *SKP2B* comparado con el promotor de los genes *ACT2*, *CYCB1;1* y *PIN6* está enriquecido en la variante histónica H3.3 frente a la H3.1 en todas las regiones del promotor analizadas pero no en la región codificante (Fig. 22A y 22B). El tratamiento con auxina incrementa los niveles de H3.3 mientras que los niveles de H3.1 no presentan diferencias significativas (Fig. 22A y 22B). En el caso de los genes control solo el gen *GRP* presenta un enriquecimiento en la variante histónica H3.3 en plantas tratadas con auxina (Fig. 22B).

La subunidad básica estructural de la cromatina es el nucleosoma que contiene más o menos 150pb de ADN enrollado alrededor del octámero de histonas formado por dos moléculas de cada histona H2A, H2B, H3 y H4. Así, la duplicación del ADN no solo consiste en la replicación del ADN sino también en la reorganización del nuevo octámero de histonas en la nueva hebra de ADN. Sin embargo, las histonas no se asocian con el ADN directamente para formar los nucleosomas sino que son las proteínas con actividad chaperona de histona las que facilitan este proceso reclutando las histonas al ADN de nueva síntesis (Polo y Almouzni 2006). El complejo con función histona chaperona “Chromatin Assembly Factor 1” “CAF-1” se asocia con la maquinaria de replicación para la deposición de la histona

H3.1 y H4 en el ADN (Fig. 21). A pesar de que las subunidades de los 2 principales complejos de deposición de histonas H3 se han mantenido tanto en animales como en plantas, su actividad desde el punto de vista bioquímico queda aún por resolver en plantas. En *Arabidopsis*, se han identificado homólogos del complejo CAF-1 que incluyen las subunidades denominadas *FAS1*, *FAS2* y *MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA* (Kaya *et al.*, 2001; Hennig *et al.*, 2003; Guitton *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2008) existiendo mutantes viables para cada una de las subunidades. La pérdida de función de cualquiera de los componentes del complejo CAF-1 en plantas afectan al ciclo celular y la formación de la heterocromatina (Schönrock *et al.*, 2005; Chen *et al.* 2008; Klapholz *et al.* 2009) sugiriendo una conservación funcional. También se ha encontrado un homologo funcional para la histona chaperona HIRA en plantas (Phelps-Durr *et al.*, 2005) aunque la función exacta es aún desconocida ya que no existen mutantes viables, lo que dificulta los análisis genéticos y morfológicos.

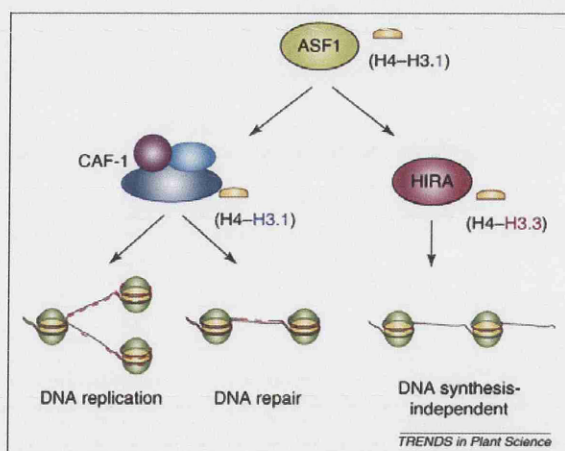


Figura 21. *Histona chaperonas implicadas en la dinámica H3-4.* CAF-1 es un complejo heterotrimérico que participa en procesos relacionados con la síntesis del ADN como replicación y reparación del ADN. El gen represor de histona A (HIRA) está implicado en la síntesis de ADN-independiente participando en la deposición de la variante H3.3. Tanto CAF-1 como HIRA están asistidos por el factor de tipo chaperona de antisilenciamiento 1 (ASF1). (Adaptado de Ramírez-Parra *et al.*, 2007)

Para analizar si mutaciones en miembros del complejo CAF-1 afectan a la expresión de *SKP2B* realizamos cruces de mutantes disponibles de *FAS1* (Ramírez-Parra *et al.*, 2007; en fondo Col-0) y *FAS2* (Serrano-Cartagena *et al.*, 1999, en fondo *Landsberg*) con plantas *SKP2B*:GUS en

fondo *Columbia* y *Landsberg* respectivamente. Como se muestra en la figura 22D, la expresión de *SKP2B* en las células fundadoras y en el meristemo de las RL desaparece, aunque sí se mantiene la expresión en el meristemo principal, donde *SKP2B* se expresa a niveles más altos que en el fondo silvestre. Sin embargo, la expresión de *SKP2B* sí se mantiene en ambos mutantes en el córtex y la epidermis de las células que bordean al primordio (Fig. 22D). Asimismo, hemos analizado la expresión del promotor de 0.5Kb*SKP2B*:GUS que mantiene la expresión en los primordios pero no en el meristemo principal ni en las células del córtex y epidermis que bordean al primordio. Sorprendentemente, hemos encontrado que la expresión de 0.5*SKP2B*:GUS en el fondo mutante *fas1* se mantiene en los primordios en todos los estadios a diferencia de lo que ocurre con la expresión del promotor completo (Fig. 22D). Estos resultados sugieren que el mantenimiento de la expresión de *SKP2B* en las células fundadoras y en el primordio de RL es dependiente de la función de CAF-1. Asimismo, en el fragmento de promotor entre -1700pb y -500pb debe existir un dominio represor de la expresión de *SKP2B* dependiente de CAF-1.

También analizamos el número de PRL/mm en el mutante *fas1* y hemos encontrado que no existen diferencias significativas con el control, no ocurre lo mismo con el número de RL emergidas donde en el mutante *fas1* hay una reducción significativa con respecto al control (Fig. 22E).

El balance de acetilación/desacetilación de la histona H3 regula la expresión de gran número de genes. Por ello decidimos analizar los niveles de acetilación del promotor de *SKP2B* mediante experimentos de ChIP (Inmunoprecipitación de la cromatina) con el anticuerpo antiH3-acetilada en las lisinas K9K14 y amplificación por PCR de diferentes regiones del promotor de *SKP2B*. Por otro lado, ya que la auxina juega un papel principal en el desarrollo de PRL decidimos analizar los niveles de acetilación en el promotor del gen *SKP2B* en el fondo mutante *slr1* y en respuesta a auxina en plantas silvestres tratadas con auxina durante 24 horas. Hemos

encontrado que el tratamiento con auxina aumenta los niveles de acetilación en la región promotora de 500pb por encima del ATG mientras que la mutación en el gen *SLR/IAA14* lo reduce casi hasta la mitad en comparación con los niveles de plantas silvestres (Fig. 23A). Como control utilizamos los genes *ACT2*, *CYCB1;1*, *GRP* y *PIN6* y como se muestra en la figura 23B los niveles de acetilación se mantienen invariables para los genes *ACT2*, *GRP* y *PIN6* tanto en plantas tratadas con auxina como en el fondo mutante *slr1*. En el caso del gen de la *CYCB1;1* muestra un ligero incremento en plantas tratadas con auxina (Fig. 23B). Estos resultados sugieren que la señalización de auxina está implicada en la regulación de los niveles de acetilación del promotor del gen *SKP2B*.

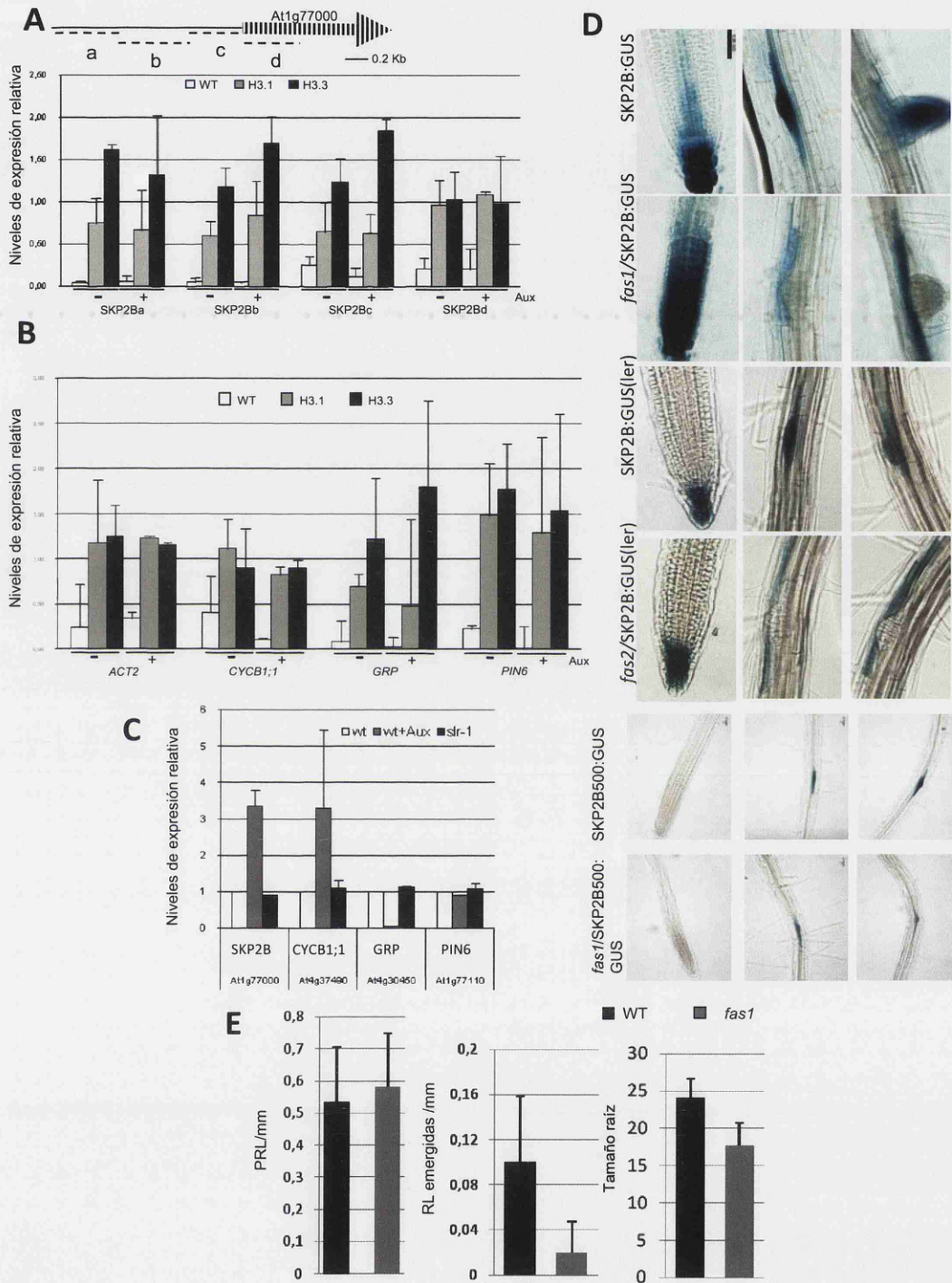


Figura 22. Control de la expresión de *SKP2B* por el intercambio de histonas *H3*. A) Representación esquemática de las regiones en el promotor de *SKP2B* en las que se ha analizado el patrón de *H3* en presencia y ausencia de auxina por inmunoprecipitación de cromatina (ChIP-PCR). B) Ensayo de ChIP-PCR de los niveles de *H3.1* and *H3.3* en los genes *ACT-2*, *CYCB1;1*, *GRP* y *PIN6*. Los resultados del ChIP-PCR muestran el DNA inmunoprecipitado usando el anticuerpo anti-MYC en wt, *H3.1:H3.1-MYC* o *H3.3:H3.3-MYC* como input. C) Niveles de expresión relativa. Datos obtenidos de geneinvestigator. D) Análisis histoquímico para tinción GUS de *SKP2B:GUS*, *fas1/SKP2B:GUS*, en ecotipo *Columbia*, *SKP2B:GUS* o *fas2/SKP2B:GUS* en ecotipo *Landsberg* y 0.5Kb*SKP2B:GUS* o *fas1/0.5KbSKP2B:GUS* en ecotipo *Columbia*. Las plantas se crecieron 6 días en medio MS. Barras corresponden a 0,05 mm. E) Cuantificación del número de PRL, emergidos, RL y tamaño de la raíz principal en plantas control y en el mutante *fas1* crecidas durante 6 días en medio MS. *, Diferencias significativas t-test $p < 0,00001$.

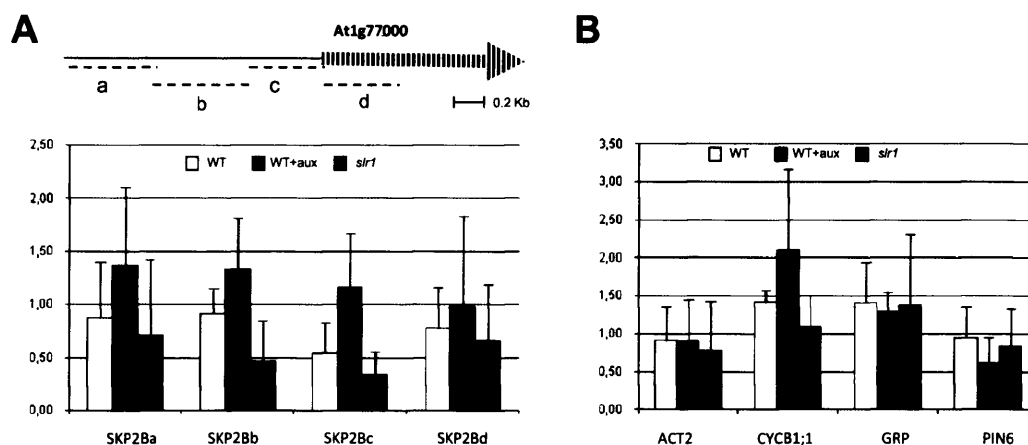


Figura 23. El locus de *SKP2B* está regulado por la acetilación de la histona H3. Se hicieron experimentos de inmunoprecipitación de cromatina de plantas silvestres de 7 días crecidas en medio MS, plantas silvestres crecidas 6 días en medio MS y tratadas durante 24H con 2-4D y plantas mutantes *slr1-1*. Se utilizó un anticuerpo específico para el reconocimiento de la histona H3 diacetilada. A) Niveles de acetilación relativa en el locus *SKP2B*. B) Niveles de acetilación relativa en los promotores de genes regulados por auxina.

Además, hemos analizado el efecto de la Trichostatina A (TSA), un inhibidor de enzimas deacetilasas, en la expresión de *SKP2B*. Para ello, hemos tratado plantas de 5 días con 20 μ M de TSA durante 48 horas. Como se observa en la figura 24A el tratamiento con TSA reduce la expresión de *SKP2B* en el meristemo principal pero no en los PIRL (Fig. 24A). Asimismo, el tratamiento con TSA reduce el número de PIRL/mm (Fig. 24B) y aumenta la distancia entre el meristemo principal (Medido desde el centro quiescente) y el primer PIRL detectado, (Fig. 24C y 24D) indicando que el TSA reduce la expresión de *SKP2B* en la raíz y bloquea el marcaje de las células fundadoras.

Se ha implicado la deposición de histonas y la herencia de marcas epigenéticas en la histona H3 en regiones reguladoras de la expresión génica con el mantenimiento de la regulación de la transcripción. Por ello, nuestros resultados sugieren que la transcripción de *SKP2B* está regulada por el intercambio de histonas H3 *in vivo* y por la acetilación de la histona H3. El tratamiento con auxina produce un aumento en los niveles de acetilación del

promotor del gen *SKP2B* y el mantenimiento de estos niveles de acetilación está alterado en el mutante *slr1-1*.

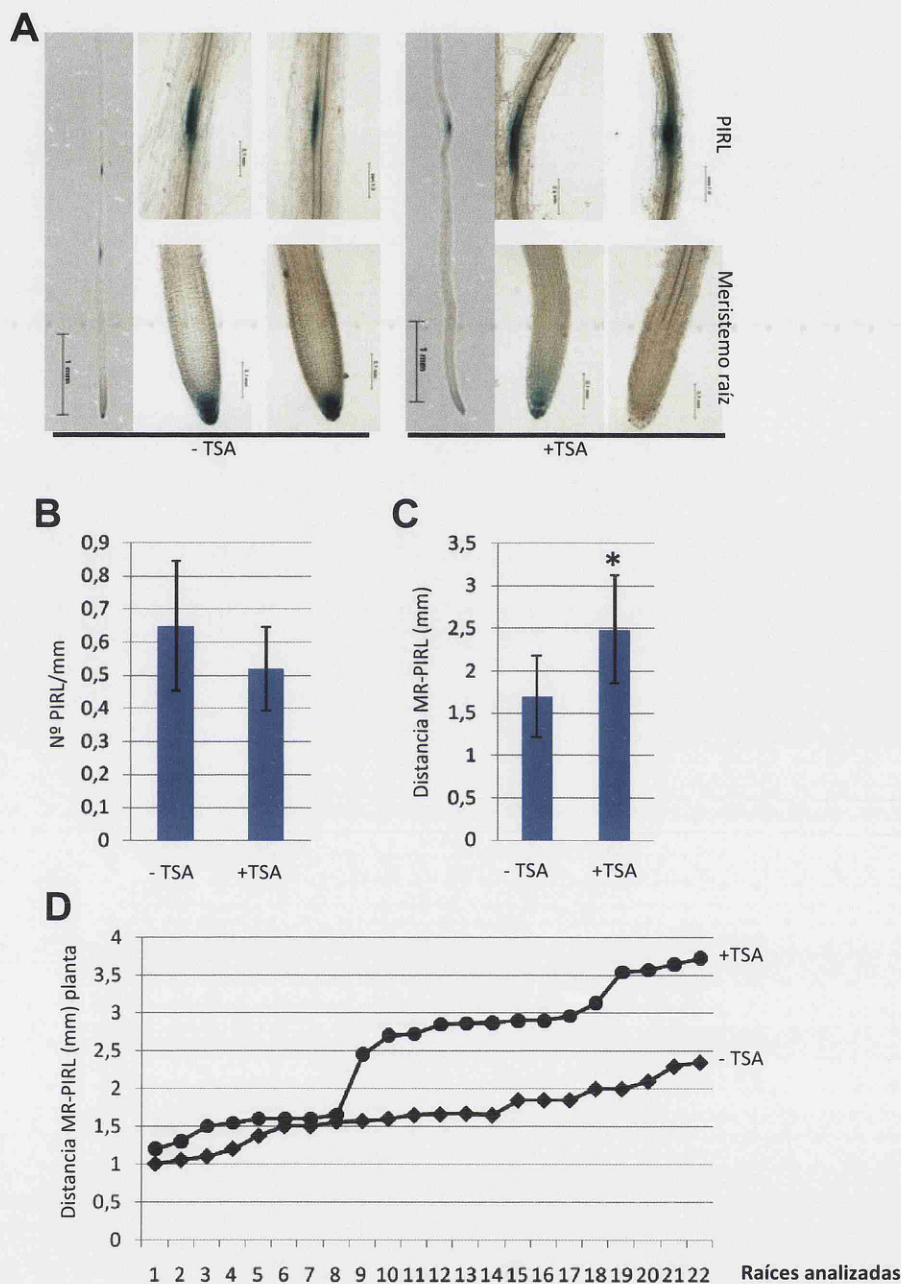


Figura 24. La acetilación de histonas regula el marcaje de las células fundadoras. Se crecieron plantas de 4 días en medio MS líquido sin y con TSA (20 μ M) durante 2 días. A) Meristemo y primer PIRL de plantas *SKP2B:GUS* tratadas y sin tratar con TSA. Barras se corresponden con 0,1 mm. B) Media del número de PIRL/mm de raíz. C) Media de la distancia del meristemo principal (Centro quiescente) al primer PIRL teñido para GUS. * Diferencias significativas t-test $p < 0,0006$. D) Medidas en raíces individuales de la distancia del meristemo principal (Centro quiescente) al primer PIRL.

5.3.3 Regulación hormonal de la expresión de *SKP2B*.

Se ha descrito en numerosas publicaciones el efecto de distintas hormonas vegetales en la formación de primordios de RL (Bao *et al.*, 2004; Ferguson *et al.*, 2005; Smet *et al.*, 2006; Kuderova *et al.*, 2008; Negi *et al.*, 2008). Para determinar el efecto de diferentes hormonas vegetales en la expresión de *SKP2B*, se crecieron plantas *SKP2B*:GUS en medio MS durante 4 días y se transfirieron a medio MS con giberelinas, auxinas, brasinoesteroides, el precursor del etileno ACC, ABA, citoquinina y ácido jasmónico.

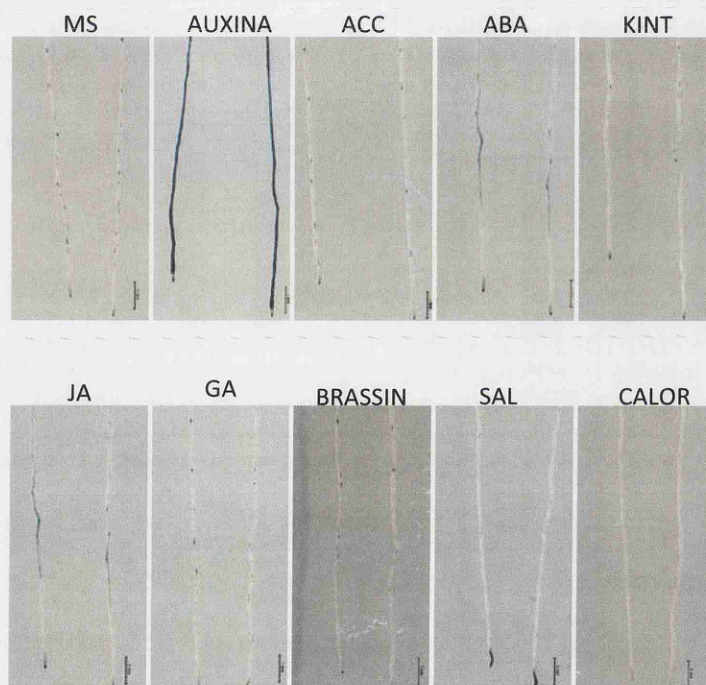


Figura 25. Regulación hormonal de la expresión de *SKP2B*. Plantas crecidas durante 5 días en MS sólido. Transferidas a MS líquido durante 24 horas con: Mock, 2,4D 10^{-7} M, ACC 10^{-6} M, ABA 10^{-6} M, Citoquinina 10^{-6} M, JA 10^{-6} M, GA 10^{-6} M, Brasinoesteroides 10^{-6} M y NaCl 150 nM. El tratamiento con calor se realizó 10 minutos a 45°C/1h a 37°C y 24 horas 22°C

Como se muestra en la figura 25, el tratamiento con auxina induce la expresión de *SKP2B* en todo el periciclo, córtex y epidermis, el tratamiento con ABA que reduce el número de primordios de RL (De Smet *et al.*, 2006b) reduce la expresión de *SKP2B* en los primordios y produce un aumento de la expresión en las células del córtex y la epidermis. El tratamiento con kinetina inhibe la formación de RL (Laplaze *et al.*, 2007) por lo que vemos

un reflejo de esta inhibición en una menor expresión de *SKP2B*. El tratamiento con ácido jasmónico produce una menor expresión de *SKP2B* en las células fundadoras y un aumento de la expresión en el córtex y la epidermis similar a lo observado en el tratamiento con ABA. Las giberelinas no producen ningún efecto significativo en la expresión de *SKP2B* al igual que los brasinoesteroides a pesar de que se ha descrito que esta hormona presenta un efecto sinérgico con la auxina en el control de la formación de RL. De hecho, el tratamiento con brasinoesteroides de plantas transgénicas con el promotor sintético DR5:GUS aumenta su expresión (Bao *et al.*, 2004).

En el caso de los efectos del estrés abiótico, como es el exceso de sal en el medio se ha descrito que el tratamiento con concentraciones moderadas de sal induce la formación de RL y disminuye el tamaño de la raíz principal. Por otro lado, el tratamiento a concentraciones altas de sal producen una inhibición en el número de RL (Gaston *et al.*, 2010). En nuestro caso, el tratamiento con sal en alta concentración produce un aumento de la expresión de *SKP2B* en el meristemo basal en la zona donde tiene lugar el marcaje de las células que darán lugar al primordio de RL. El tratamiento por calor produce una clara disminución en la expresión de *SKP2B* (Fig. 25).

5.3.4 La expresión de SKP2B en las células fundadoras es dependiente de la señalización de auxina

Se ha descrito en varios trabajos que la señalización mediada por auxina juega un papel principal tanto en la especificación de las células fundadoras (De Smet *et al.*, 2006; De Rybel *et al.*, 2010; Moreno-Risueno *et al.*, 2010) como en el posterior desarrollo del primordio de RL (Fukaki *et al.*, 2002; Vanneste *et al.*, 2005). Algunas mutaciones que afectan a la maquinaria de señalización de auxina reducen el número de RL. Para analizar la regulación de la expresión de *SKP2B* mediada por auxina se trataron con auxina plantas transgénicas con la construcción *SKP2B*:GUS. Como se muestra en la figura 26A la auxina induce la expresión de *SKP2B*

en la raíz a lo largo de todo el periciclo, córtex y epidermis con un comportamiento similar al del promotor sintético de respuesta a auxina DR5:GUS.

También hemos analizado la expresión de *SKP2B* en distintos fondos mutantes que tienen disminuida la respuesta a auxina. Para ello hemos cruzado plantas *SKP2B*:GUS con el mutante *tir1-1* (Ruegger *et al.*, 1998), *axr1-12* (Hobbie and Estelle, 1995) o *ibr5-1* (Monroe-Augustus *et al.*, 2003) . Hemos encontrado que mutaciones en estos genes reducen tanto la expresión de *SKP2B* como la inducción de *SKP2B* dependiente de auxina (Fig. 26A). En el caso de los mutantes *tir1-1* y *axr1-12* encontramos, además una reducción significativa en el número de PIRL/mm. En el caso del mutante *ibr5* no hay diferencias significativas en el número de PIRL/mm con respecto al control (Fig. 26B). Este resultado sugiere que *IBR5* es necesario para la respuesta a auxina de *SKP2B* pero no para la especificación de las células fundadoras.

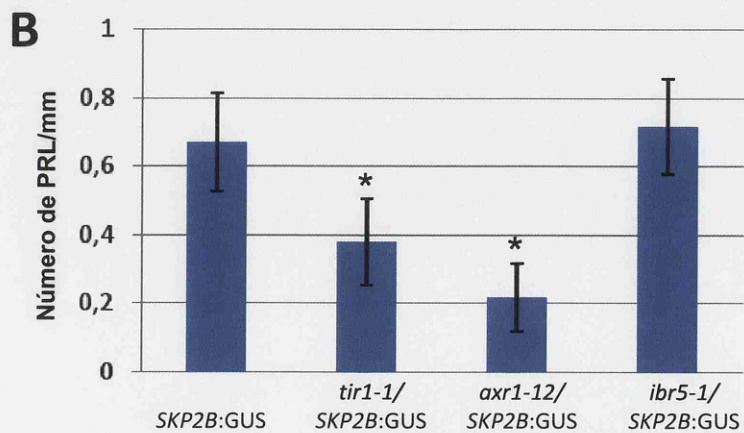
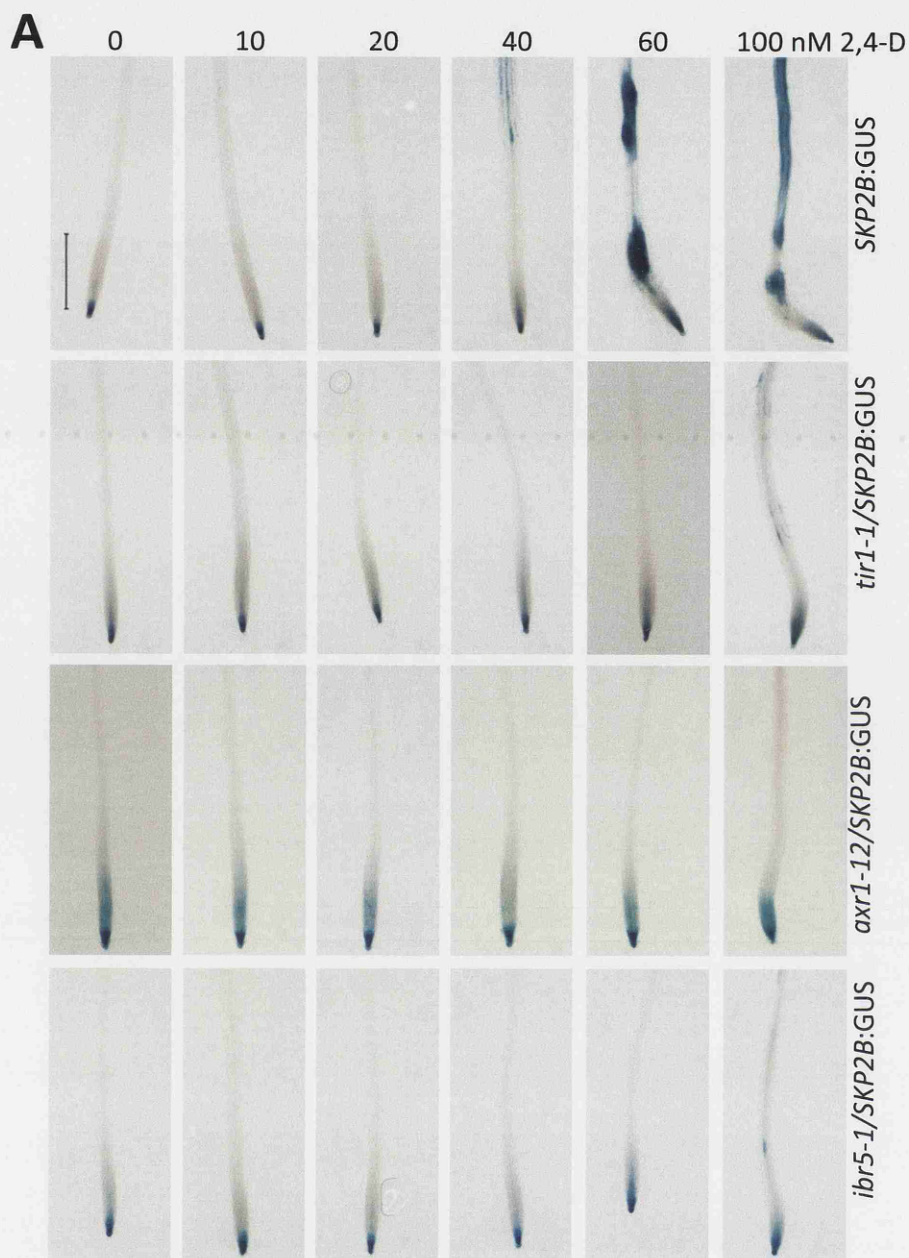


Figura 26: Análisis histoquímico para GUS de plantas SKP2B:GUS y SKP2B:GUS en los fondos mutantes *tir1-1*, *axr1-12* and *ibr5-1*. Se crecieron plantas durante 4 días en medio MS y se pasaron a medio MS con 0, 10, 20, 40 60 or 100 nM of 2,4-D durante 2 días. A) Meristemo basal. B) Cuantificación del número de PIRL teñidos para actividad GUS en los diferentes fondos mutantes mencionados y crecidos en medio MS durante 6 días.

Se han descrito varias mutaciones dominantes negativas en diferentes genes de la familia Aux/IAA y que tienen alterada la respuesta a auxina. Hemos analizado la expresión de *SKP2B* en los mutantes *axr2*, *axr3*, *slr1-1* e *iaa28*. En el caso de los fondos mutantes *axr2* y *axr3* encontramos que *SKP2B* presenta un patrón de expresión ligeramente alterado y que el tratamiento con auxina induce la expresión de *SKP2B* a niveles similares al control en ambos mutantes (Fig.27).

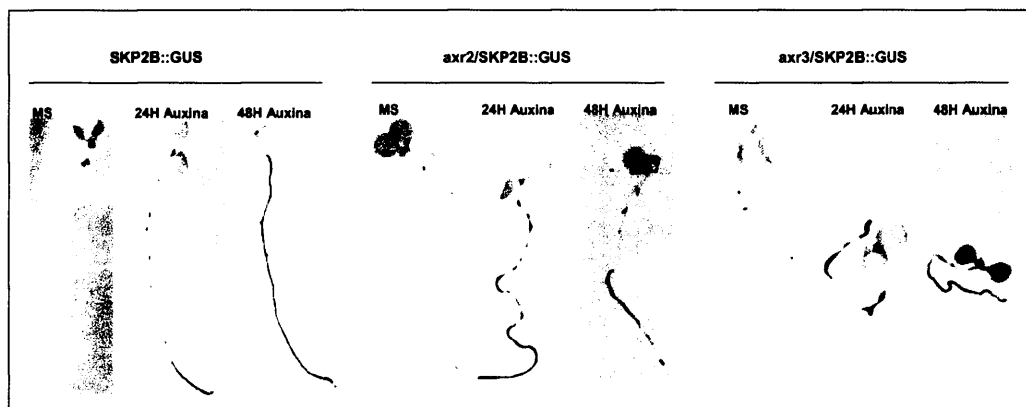


Figura 27. Expresión de *SKP2B* en fondos mutantes *axr2* y *axr3*. Tinción para GUS de plantas *SKP2B::GUS*, *axr2/SKP2B::GUS* y *axr3/SKP2B::GUS* en medio MS durante 7 días y plantas *SKP2B::GUS*, *axr2/SKP2B::GUS* y *axr3/SKP2B::GUS* en medio MS durante 5 días que posteriormente se pasaron a medio con NAA durante 24 y 48 horas.

En el caso mutante *slr1-1* observamos que se elimina completamente la expresión de *SKP2B* en las células fundadoras y en los primordios de RL. De hecho, en el mutante *slr1-1* solo encontramos expresión de *SKP2B* en el meristemo principal de la raíz (Fig. 28A). Además, el tratamiento con auxina de plantas *slr1-1/SKP2B::GUS* aumenta ligeramente la expresión de *SKP2B* en las células de periciclo de la zona de diferenciación específicamente en las células correspondientes a las células fundadoras de los PIRL (Fig. 28A).

Se ha propuesto recientemente que la especificación de las células fundadoras en el meristemo basal es independiente del módulo de señalización de auxina SLR/IAA14 pero dependiente del módulo controlado por IAA28 (De Rybel *et al.*, 2010). Para analizar la expresión de *SKP2B* en el fondo mutante *iaa28* cruzamos plantas *SKP2B::GUS* con el mutante *iaa28*

(ambos en fondo WS). Hemos encontrado que el número de PIRL en plantas *iaa28/SKP2B:GUS* es menor que en el control (Fig. 28C) y que la expresión de *SKP2B* en los primordios en el fondo mutante *iaa28* es similar al control (Fig. 28D). Además, sorprendentemente, hemos visto que el tratamiento con auxina induce la expresión de *SKP2B* en el mutante *iaa28* a niveles similares al control (Fig. 28E). Sin embargo, hay que destacar que esta inducción no se produce en la zona correspondiente al meristemo basal donde tiene lugar la especificación de las células fundadoras (Fig. 28E). Estos resultados sugieren que tanto IAA28 como IAA14 están controlando la especificación de las células fundadoras en el meristemo basal de la raíz.

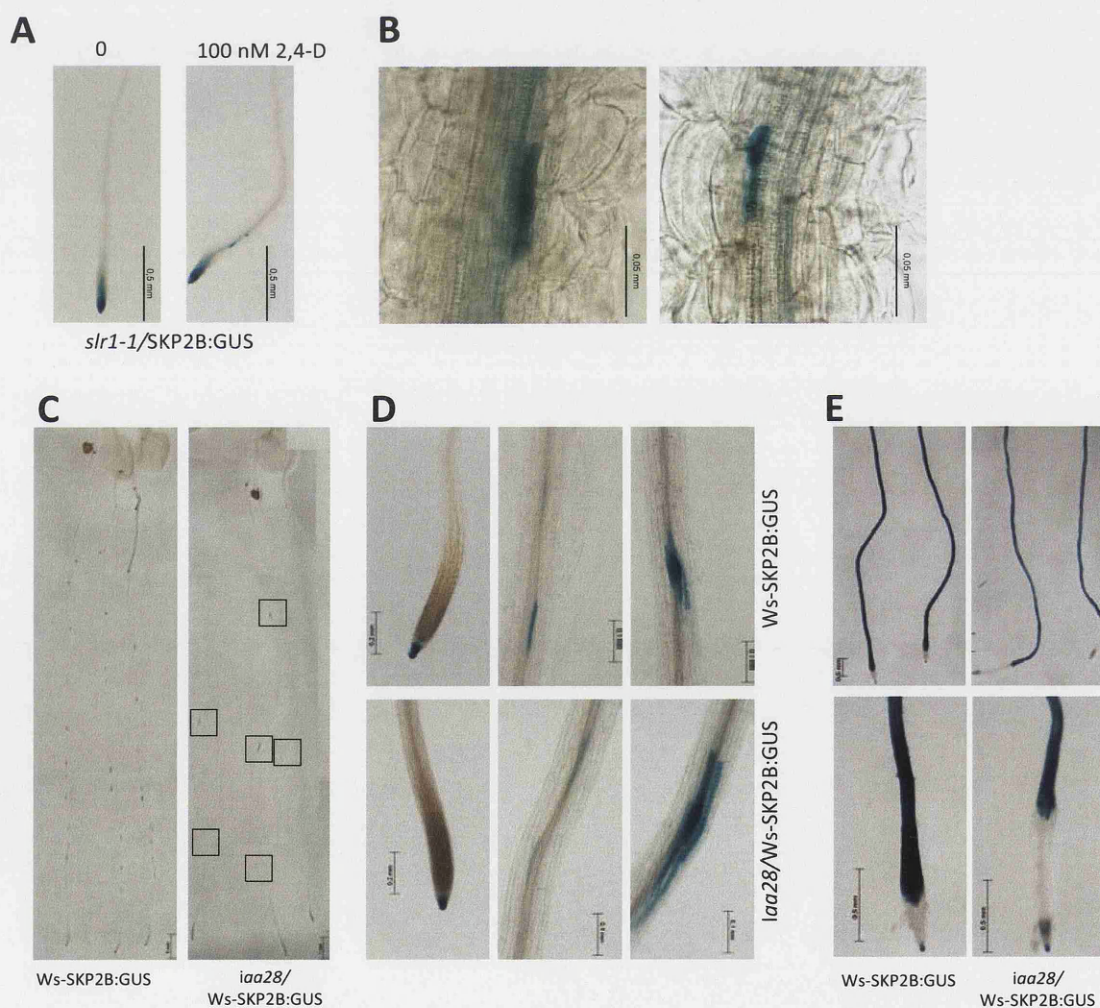


Figura 28. Tinción histoquímica para *SKP2B:GUS* en fondos mutantes *slr1-1* e *iaa28*. Se crecieron plantas durante 4 días en medio MS y se transfirieron a medio MS y medio MS 100nM de 2-4 D durante 2 días. A) Plantas *slr1-1/SKP2B:GUS* en el meristemo basal de la raíz. B) Aumento de la zona superior del meristemo teñida para GUS. C) Raíces *Ws-SKP2B:GUS* e *iaa28/Ws-SKP2B:GUS* de plantas crecidas en medio MS durante 6 días. Los cuadrados indican la localización de primordios teñidos en el fondo mutante *iaa28*. D) Meristemo principal y detalle de primordios en plantas *Ws-SKP2B:GUS* y plantas *iaa28/SKP2B:GUS*. E) Plantas *Ws-SKP2B:GUS* e *iaa28/SKP2B:GUS* crecidas en MS 4 días y tratadas con auxina durante dos días.

5.3.5 La expresión de *SKP2B* está alterada en el mutante *skp2b*.

Puesto que la línea *SKP2B*:GUS es un buen marcador de la formación de primordios de raíces laterales y *SKP2B* parece controlar la formación de RL decidimos analizar si la expresión de *SKP2B* estaba alterada en el fondo mutante *skp2b*. El análisis de plantas *skp2b*/*SKP2B*:GUS reveló un patrón de expresión de *SKP2B* alterado en el mutante. Por un lado, encontramos una mayor expresión de *SKP2B* en nerviaciones de hoja, estomas y en la vasculatura del hipocotilo. Por otra parte, en el caso de la raíz encontramos una mayor expresión a lo largo de todas las células del periciclo de la zona madura de la raíz en comparación con la línea *SKP2B*:GUS (Fig. 29).

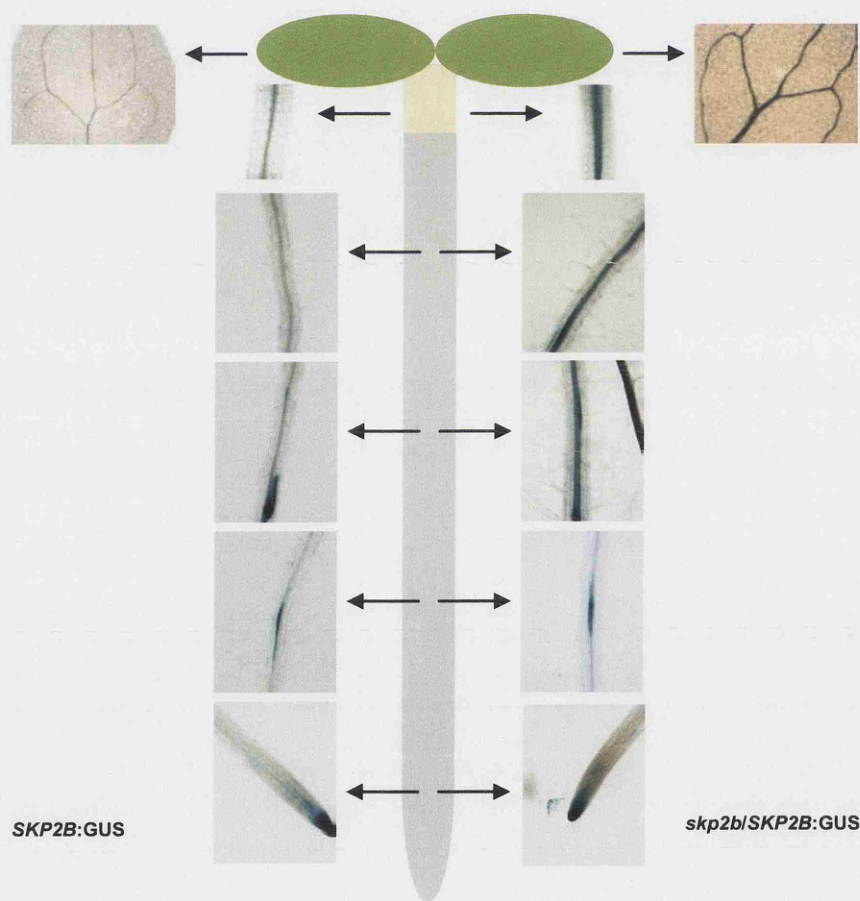


Figura 29. La expresión de *SKP2B* está alterada en el fondo mutante *skp2b*. Representación esquemática de una raíz con fotos de las distintas zonas señaladas por flechas de la expresión de plantas *SKP2B*:GUS y *skp2b*/*SKP2B*:GUS teñidas para actividad GUS.

Estos resultados sugieren la existencia de una regulación de retroalimentación negativa en la que probablemente el complejo SCF^{SKP2B} tenga como diana un factor de transcripción implicado en el control de su expresión de forma directa o indirecta. Y que por tanto, la ausencia de *SKP2B* está promoviendo el incremento de su expresión.

5.4 *SKP2B* como herramienta para la identificación de genes implicados en el desarrollo radicular en *Arabidopsis*.

Para identificar genes que se expresan en las células fundadoras y durante los estadios iniciales de formación de primordios de RL hemos utilizado como herramienta la expresión altamente específica de *SKP2B* en estas células. Para ello fusionamos el promotor de *SKP2B* al gen reportador de la GFP. El análisis de la expresión de *SKP2B* por microscopía confocal detectó señal para GFP en las células fundadoras del primordio, en primordios de RL (Fig. 29A,29B,29C) y en el meristemo principal de la raíz (Fig. 29D).

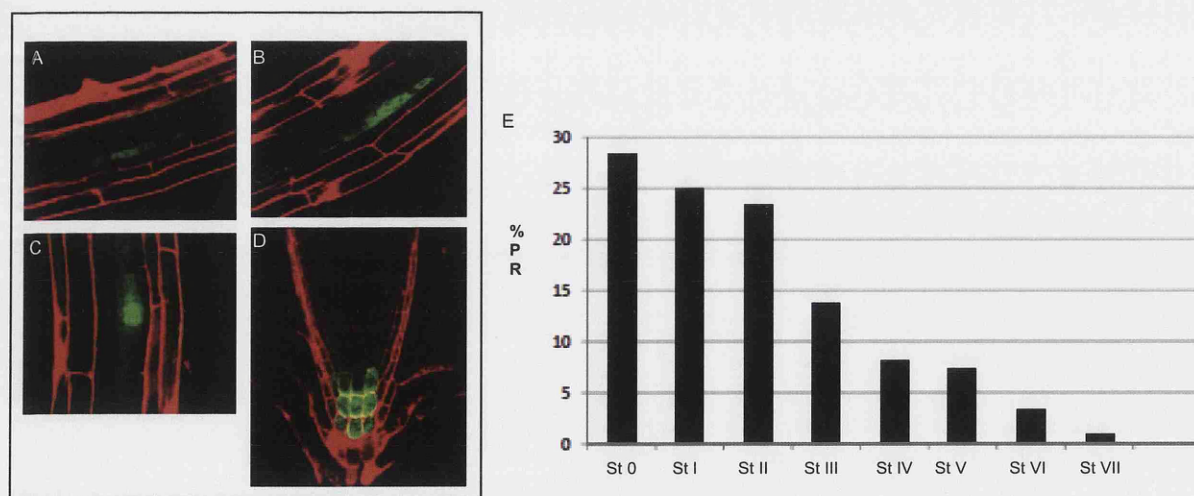


Figura 29. Análisis de expresión de *SKP2B:GFP*. A-C) Imágenes de microscopía confocal de plantas *SKP2B:GFP* teñidas con yoduro de propidio. Expresión de *SKP2B* en PIRL en estadio II, III y V, respectivamente (A-C) y expresión de *SKP2B:GFP* en el meristemo principal (D). E) Representación del % de PRL de plantas de 5 días crecidas en las mismas condiciones que las plantas utilizadas para el experimento de cell sorting.

Para llevar a cabo un análisis transcriptómico de las células en las que *SKP2B* se está expresando realizamos un experimento de separación celular utilizando un citómetro de flujo acoplado a un separador de fluorescencia. Para ello, crecimos plantas *SKP2B:GFP* durante 5 días en medio MS y se generaron 2 tipos de muestras: I) raíces completas sin parte aérea y II) meristemos de la raíz principal. Se disociaron en células individuales (protoplastos) mediante digestión enzimática de las paredes celulares. Estas raíces de 5 días contienen principalmente primordios en estadio 0 a estadio III (Fig. 29E). A continuación los protoplastos que expresaban GFP se separaron mediante un separador de células activado por fluorescencia. Se prepararon 3 muestras biológicas independientes. Posteriormente se extrajo el ARNm y se hibridó con el chip ATH1 de Affymetrix que cuenta con 22746 pruebas. Para identificar genes que se expresan específicamente en las células fundadoras y en estadios tempranos de formación de primordios de RL comparamos los dos tipos de muestras, substrayendo la expresión de los genes que se expresan en meristemo con los que se expresan en la de raíz completa. Utilizando este análisis comparativo hemos identificado una lista de genes potencialmente implicados en el marcaje de las células que darán lugar al primordio y en el desarrollo temprano del primordio. Después de la normalización de los datos, encontramos que solo una pequeña fracción de genes variaban en su expresión en las tres réplicas biológicas analizadas, indicando que la reproducibilidad del experimento es alta. Para evitar falsos positivos se hicieron correcciones de comparaciones múltiples y se calcularon los *valores q* según el método de Storey y Tibshirani (2003). Nuestra búsqueda se dirigió a genes que estuvieran enriquecidos 2 veces ($pval < 0.05$) en la raíz entera frente al meristemo. Hemos identificado más de 200 genes que muestran diferencias significativas (Anexo Tabla3). Dentro de esta lista, podemos destacar el gen *LAX2* cuyo homólogo *LAX3* se ha descrito como implicado en la emergencia del primordio (Swarup *et al.*, 2008) o los genes que codifican para los transportadores de auxina PIN3 y PIN4, el gen que

codifica para una enzima YUCCA implicada en la biosíntesis de auxina y el gen *GH3* por su posible papel en la regulación y la señalización de auxina.

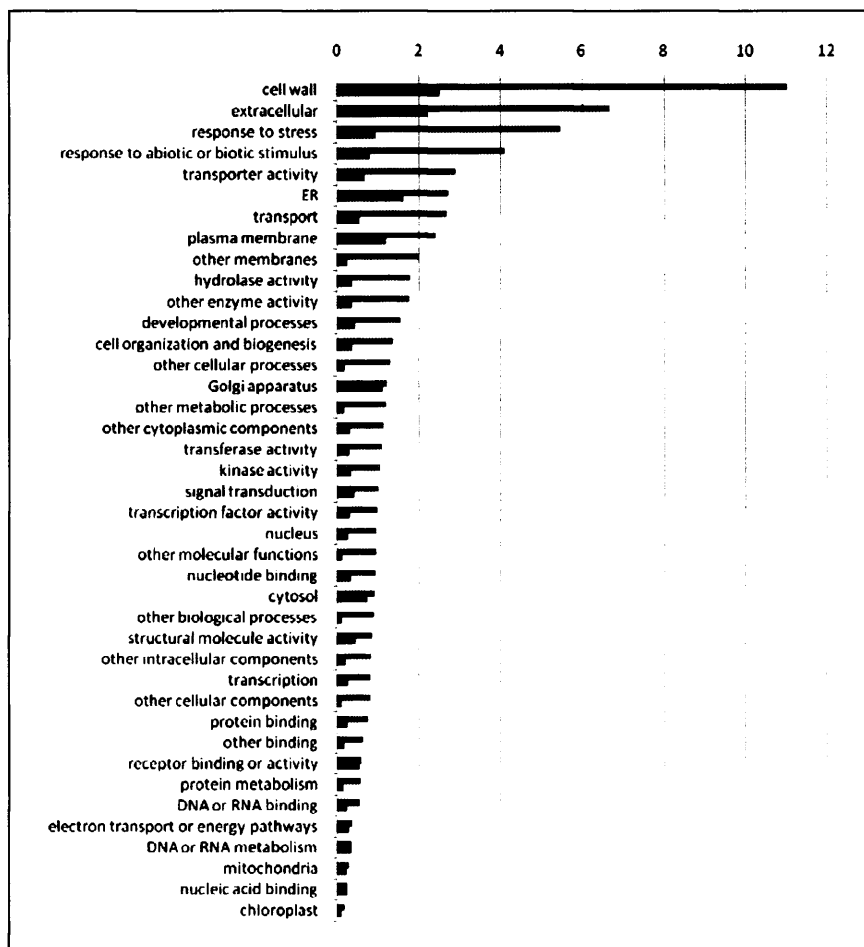


Figura 30. Porcentaje de genes expresados en PIRL por categorías funcionales. Azul: Porcentaje de genes encontrados en los PIRL. Rojo: Porcentaje de genes encontrados en el genoma de *Arabidopsis*. Classification SuperViewer Tool w/ Bootstrap. Toronto.

Hemos clasificado estos genes por categorías funcionales (Provart *et al.*, 2003) (Fig. 30). Sorprendentemente, una gran cantidad de estos genes codifican para enzimas remodeladoras de pared celular. Análisis de expresión de raíces tratadas con auxina han encontrado altos niveles de expresión de genes que codifican para *pectatoliasa*, *pectinmetilesterasa* y *expansinas* (Laskowski *et al.*, 2006). Se ha propuesto que estas enzimas participan en la separación de las células del córtex y de la epidermis para facilitar la emergencia del primordio. Estudios publicados recientemente han mostrado que la expresión de genes potencialmente implicados en remodelación de pared celular se expresan en las capas celulares frente al primordio de RL (González-Carranza *et al.*, 2007; Ogawa *et al.*, 2009). Sin

embargo, queda aún por resolver si la inducción mediada por auxina de genes implicados en separación celular produce la expresión de estos genes en el propio primordio de RL o en los tejidos que lo rodean.

También hemos visto incrementada la expresión de un alto número de genes que codifican para peroxidasas, enzimas que se han implicado en el control de la señalización redox y el desarrollo de la raíz (Tsukagoshi *et al.*, 2010). Entre ellos, hemos identificado el gen que codifica para el factor de transcripción *UPB1* implicado recientemente en la regulación del balance de especies reactivas de oxígeno en la zona comprendida entre proliferación y elongación de la raíz (Tsukagoshi *et al.*, 2010). También hemos encontrado un número significativo de proteínas implicadas en transducción de señal y factores de transcripción. Como se ha comentado anteriormente la auxina juega un papel fundamental en el control de la formación de RL en plantas. Por ello, hemos comparado los genes que se expresan en los PIRL con los expresados en la formación de RL por tratamientos con auxina tanto en plantas silvestres como en el mutante *slr1* (Himanen *et al.*, 2002; Vanneste *et al.*, 2005) (Anexo Fig. 31). Además hemos comparado la expresión en los PIRL con la expresión de genes en el meristemo basal de la raíz en fase y en antifase con el marcador DR5 descritos en el trabajo publicado recientemente por Moreno-Risueño *et al.*, (2010). (Anexo Fig. 31). En los diagramas de Venny (Anexo Fig. 31) podemos destacar que existe un mayor número de genes comunes entre los genes que se expresan en los PIRL y los genes reprimidos por auxina que entre los genes que se expresan en los PIRL y los inducidos por auxina. Se podría pensar que estos genes reprimidos por auxina podrían estar enriquecidos en las células fundadoras o bien en el primordio en un estado no proliferativo, y que desaparece su expresión cuando se empieza a acumular auxina en el primordio. En el caso de los genes que se han publicado como potencialmente implicados en el marcaje en el meristemo basal de las células del periciclo que van a dar lugar a un primordio y que por tanto están en fase con el marcador DR5:LUC (Moreno-Risueño *et al.*, 2010) encontramos genes como *FEZ* que

codifica para un factor de transcripción de tipo NAC y para el que se describió que tenía un patrón de expresión que coincidía con las células del periciclo que se marcan en el meristemo basal para dar lugar al primordio.

5.4.1 Identificación de genes que participan en el desarrollo del sistema radicular.

Los factores de transcripción juegan un papel clave en el desarrollo, por lo que hemos realizado un análisis funcional del desarrollo del sistema radicular de 3 factores de transcripción identificados en los PIRL y que pertenecen a 3 familias distintas *RAP2.3* (AP2-ERF); *TMO7* (bHLH) y *FEZ* (NAC-domain). Hemos identificado mutantes de T-ADN para estos genes y hemos realizado una caracterización fenotípica del proceso de formación de RL. En primer lugar medimos el tamaño de la raíz y el número de RL. Como se muestra en la figura 32A, los tres mutantes muestran alteraciones en el crecimiento de la raíz, en el caso de los mutantes *tmo7* y *fez3* presentan una raíz principal más corta que el silvestre mientras que el mutante *rap2.3* presenta una raíz más larga que el silvestre (Fig. 32A). Cuando analizamos la densidad de RL (PRL/mm raíz principal) encontramos que solo el mutante *rap2.3* desarrolla un menor número de raíces laterales que el silvestre (Fig. 32B). Sin embargo, si examinamos en detalle el número de primordios en cada estadio encontramos algunas diferencias significativas. En el mutante *rap2.3* hay menos primordios del estadio V al VIII, ya que no hay un mayor número de primordios emergidos este resultado sugiere un retraso en la transición del estadio IV al V (Fig. 32C). En caso del mutante *fez3* el número de primordios en estadio V y VII es significativamente menor (Fig. 32D). Sin embargo, en este mutante hay un mayor número de primordios emergidos sugiriendo que *FEZ* estaría controlando la emergencia del primordio. Por otro lado, el mutante *tmo7* presenta una acumulación de primordios en estadio VI sugiriendo un defecto en la transición del estadio VI al VII (Fig. 32E). Para analizar si estos mutantes afectan a la expresión de *SKP2B* hemos realizado cruces de estos mutantes con plantas *SKP2B:GUS*. En el

caso del mutante *tmo7* (Fig. 32F) observamos un aumento de la expresión de *SKP2B* en los PIRL y en las células del periciclo a lo largo de toda la raíz hasta la zona de diferenciación mientras que en plantas control solo encontramos expresión de *SKP2B* en los PIRL (Fig. 32G y 32H). En el caso del mutante *rap2.3* estos análisis se mostraron en la figura 20.

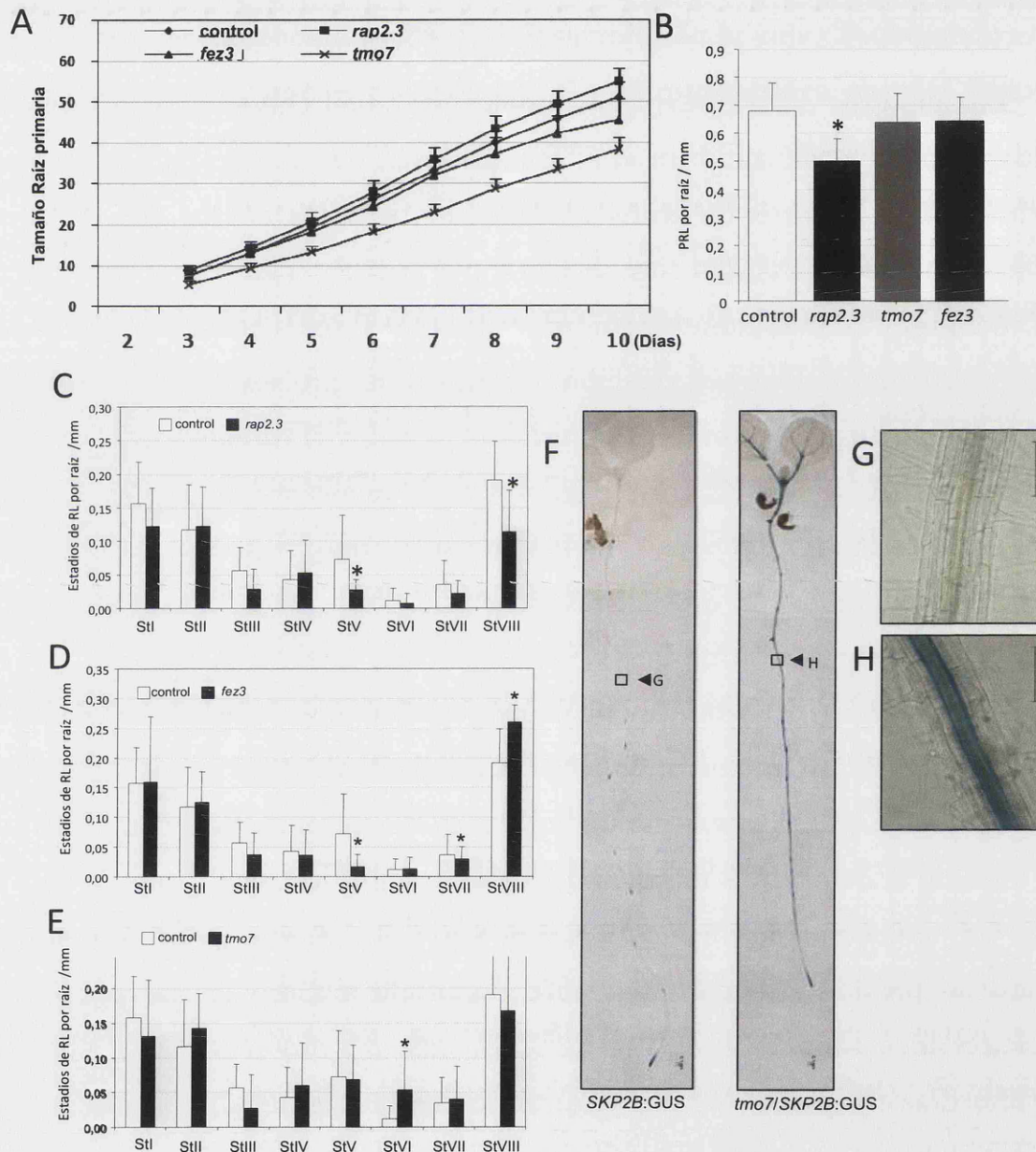


Figura 32. Mutaciones en los genes *RAP2.3*, *TMO7* y *FEZ* afectan la morfología de la raíz. A) Medidas de la raíz principal de plantas crecidas en MS durante diez días. B) Medidas de RL (PRL+RL emergidas) de plantas de 6 días crecidas en MS *Diferencias estadísticamente significativas medidas con T-student valor $p < 0.001$. C) Medidas de todos los estadios de PRL/mm de plantas control y el mutante *rap2.3*. D) Medidas de todos los estadios de PRL /mm de plantas control y el mutante *fez3*. E) Medidas de todos los estadios de PRL/mm de plantas control y el mutante *tmo7*. *Diferencias estadísticamente significativas medidas con T-student valor $p < 0.001$. F) Tinción GUS de plantas de 6 días *SKP2B:GUS* y *tmo7/SKP2B:GUS*. Las barras de escala indican 0.1mm. G) Foto de sección señalada en F de la raíz *SKP2B:GUS*. H) Foto de sección señalada en F de la raíz *tmo7/SKP2B:GUS*. Las barras de escala indican 0.1 mm.

5.5 Búsqueda e identificación de mutantes con un patrón de expresión de *SKP2B* alterado.

La expresión de *SKP2B* es un buen marcador para estudiar el proceso de formación de RL en la raíz, por lo que decidimos utilizar plantas con fondo *SKP2B::GUS* para realizar una mutagénesis con EMS (Etilmetanosulfonato). Hemos llevado a cabo un rastreo de mutantes que presentaran un patrón de expresión alterado en los primordios de RL y/o el meristemo radicular. Hemos identificado varios mutantes que hemos denominado *sbrel* (*skp2b* *root* *expression* *less*) (Fig. 33).

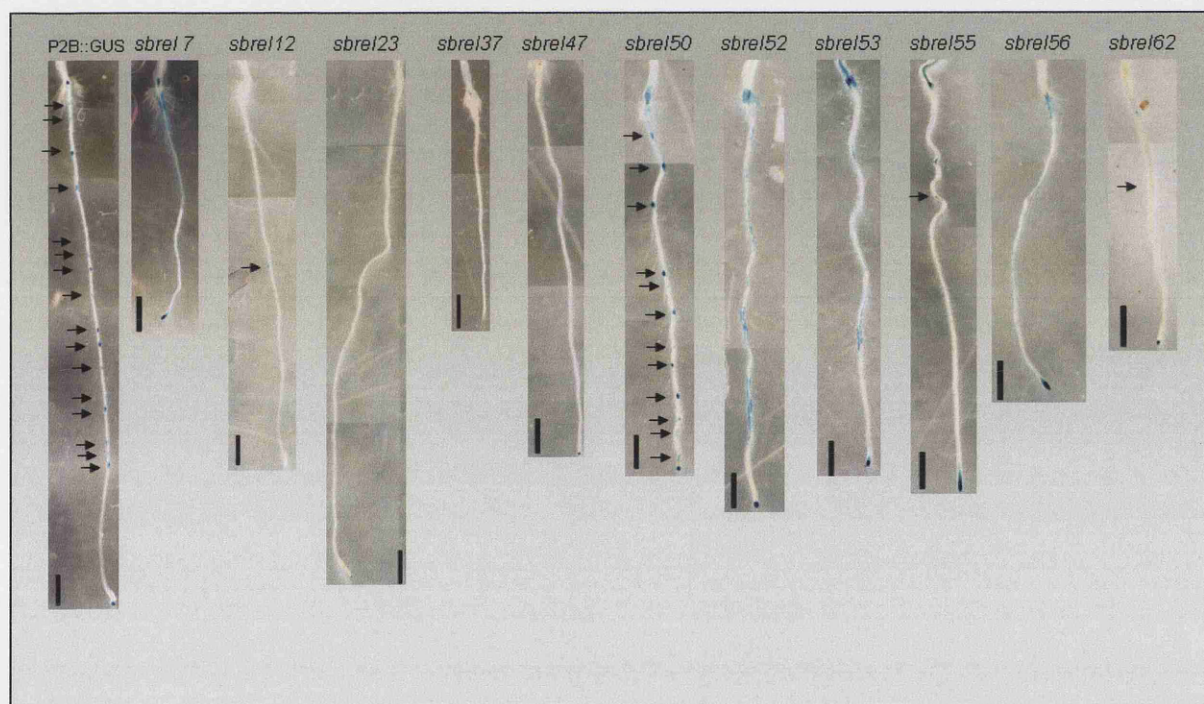


Figura 33. Representación de mutantes *sbrel* (*skp2b* *root* *expression* *less*) seleccionados tras 2 retrocruces con la línea *SKP2B::GUS*. Tinción histoquímica para GUS de mutantes *sbrel* sobre fondo *SK2B::GUS*

Hemos clonado 2 de los mutantes obtenidos. El mutante *sbrel7* presenta una mutación en el gen *CRE1*, que codifica para el receptor de citoquininas. En el caso de este mutante no se continuó el trabajo porque ya había datos suficientes en la bibliografía sobre la función de *CRE1* en el desarrollo de raíz (De León *et al.*, 2004; Higuchi *et al.*, 2004; Franco-Zorrilla *et al.*, 2005; Riefler *et al.*, 2006; Eckardt *et al.*, 2006). El análisis del mutante

sbrel12 reveló un fenotipo muy similar al mutante del gen *AXR1*. Al realizar un test de alelismo comprobamos que *sbrel12* era un alelo del gen *AXR1*; por lo que no continuamos con la caracterización de *sbrel12* ya que existían datos previos sobre su función en el desarrollo de raíz (Hobbie *et al.*, 1995) y de la función bioquímica de estas proteínas (Del Pozo *et al.*, 2002).

Además hemos iniciado el clonaje de otros 2 mutantes *sbrel52* y *sbrel50*. La mutación de *sbrel52* es recesiva, afecta drásticamente a la expresión de *SKP2B* y provoca una disminución muy significativa del número de raíces laterales. En caso de la mutación *sbrel50* también hemos comprobado que es una mutación recesiva. Esta mutación reduce la longitud de la raíz principal y produce un aumento del número de raíces laterales (Fig. 34). Además en este mutante se observa una parada a partir del cuarto día en el crecimiento de la raíz principal, un aumento del número de raíces laterales y un aumento del número de pelos radiculares con respecto al silvestre (Fig. 34).

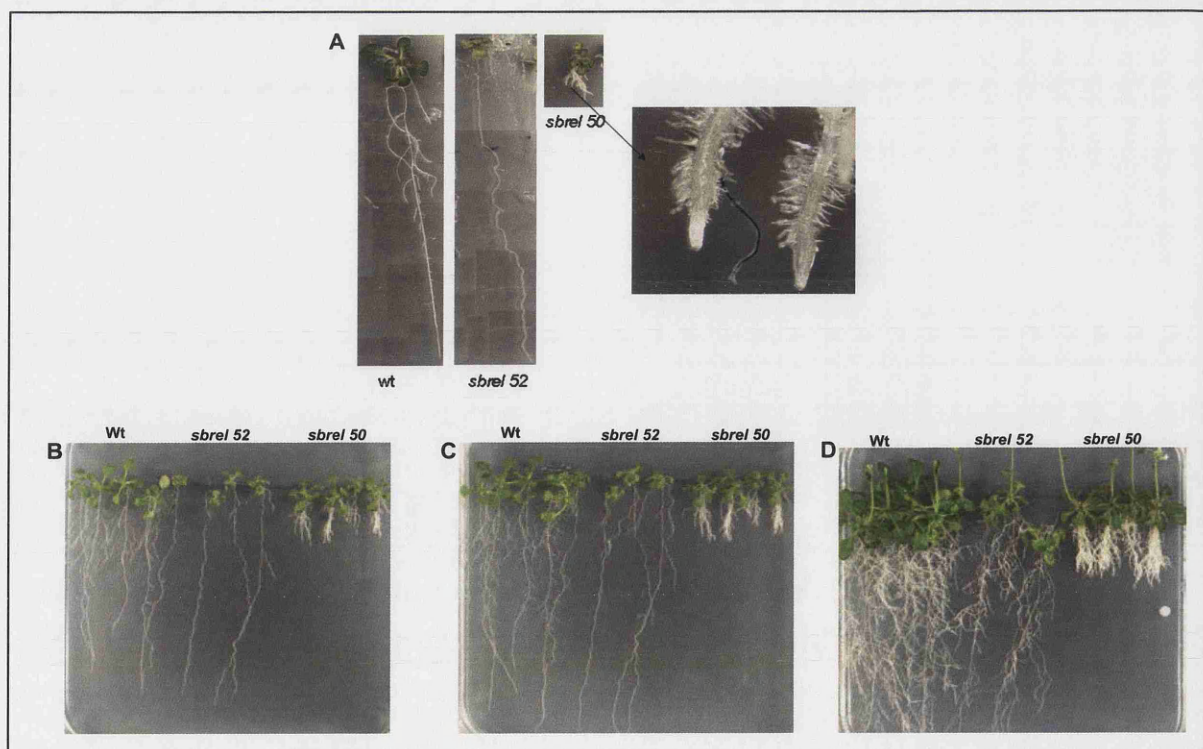


Figura 34. Los mutantes *sbrel50* y *sbrel52* tienen afectado el desarrollo radicular. A) Plantas silvestres y plantas mutantes *sbrel52* y *sbrel50* crecidos en medio MS durante 10 días. La flecha indica una foto en detalle del mutante *sbrel50*. B) Plantas silvestres, *sbrel52* y *sbrel50* crecidas durante 14 días en medio MS. C) Plantas silvestres, *sbrel52* y *sbrel50* crecidas durante 18 días en medio MS. D) Plantas silvestres, *sbrel52* y *sbrel50* crecidas durante 22 días en medio MS.

5.5.1 Mutante *sbrel52*

5.5.1.1 Caracterización fenotípica del mutante *sbrel52*

Hemos realizado una caracterización fenotípica del mutante *sbrel52* en la formación de RL. Como se muestra en la figura 35A el mutante *sbrel52* presenta una disminución significativa del número de raíces laterales. Se ha medido la longitud de la raíz a varios días de crecimiento (Fig. 35B) en comparación con el control *SKP2B:GUS* y hemos observado que la raíz del mutante *sbrel52* es ligeramente más pequeña que la del control. Además se contaron el número de primordios en plantas de 7 días (Fig. 36A) y hemos observado una reducción de más de la mitad del número de primordios en comparación con plantas silvestres. Además, como podemos observar en la figura 36B de entre los primordios que se desarrollan en mutante *sbrel52* hay una acumulación de primordios en estadio IV.

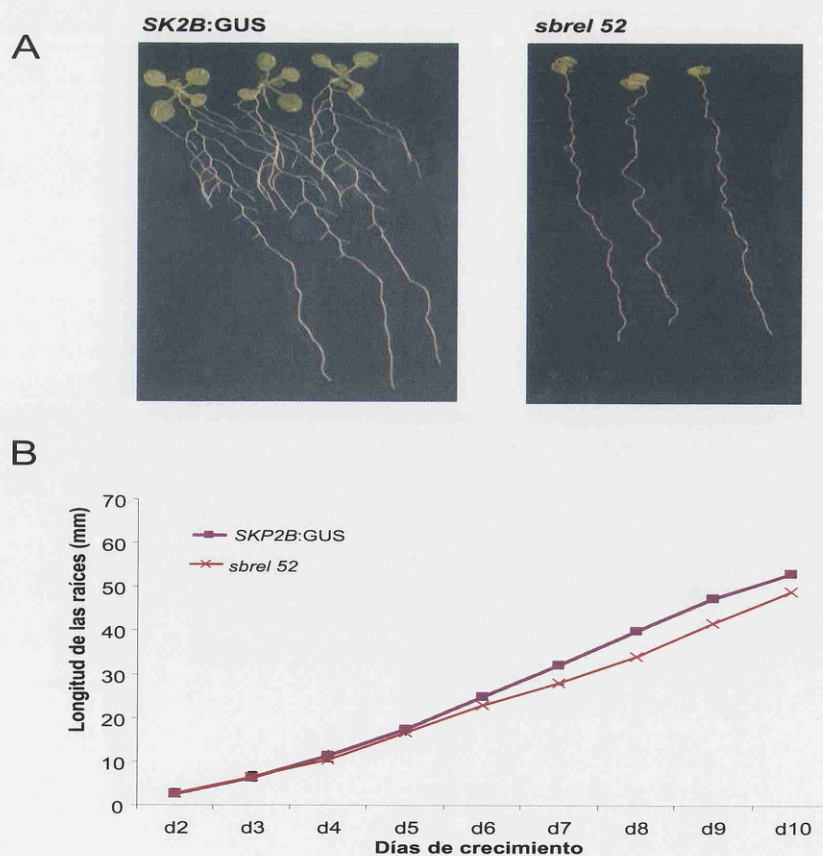


Figura 35. El mutante *sbrel52* tiene el desarrollo radicular afectado. A) Plantas silvestres y plantas mutantes *sbrel52* crecidas durante 10 días en medio MS. B) Medidas cada 24H de la longitud de raíz principal durante 10 días de plantas silvestres y *sbrel52* crecidas en MS.

También hemos analizado en detalle la morfología de estos primordios y hemos encontrado que presentan un patrón de división celular alterado en comparación con primordios de plantas silvestres. Como se observa en la figura 37, la mutación en *sbrel52* afecta a los planos de división de las células del primordio, formándose células de menor tamaño.

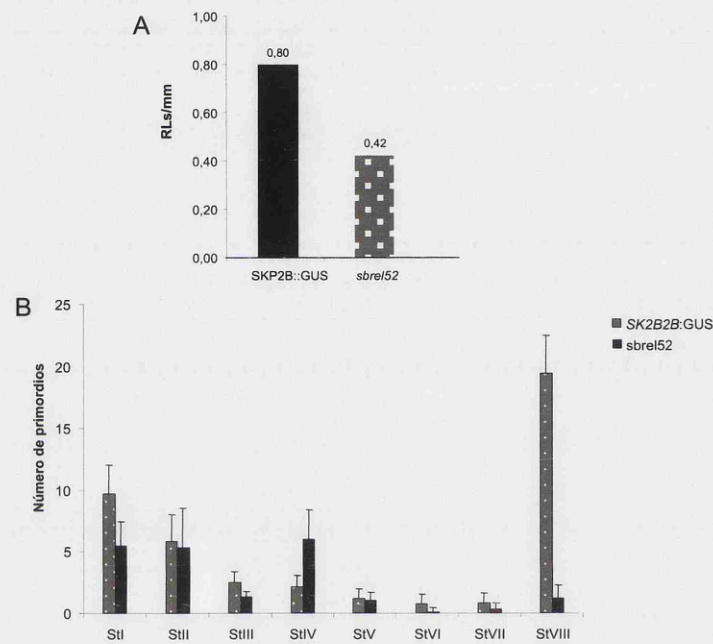


Figura 36. El mutante *sbrel52* presenta una acumulación de primordios en estadio IV. A) Medidas del número de primordios de plantas de 7 días *sbrel52* y control *SKP2B::GUS*. B) Medidas del número de primordios por estadio de desarrollo en plantas de 7 días *sbrel52* y control *SKP2B::GUS*.

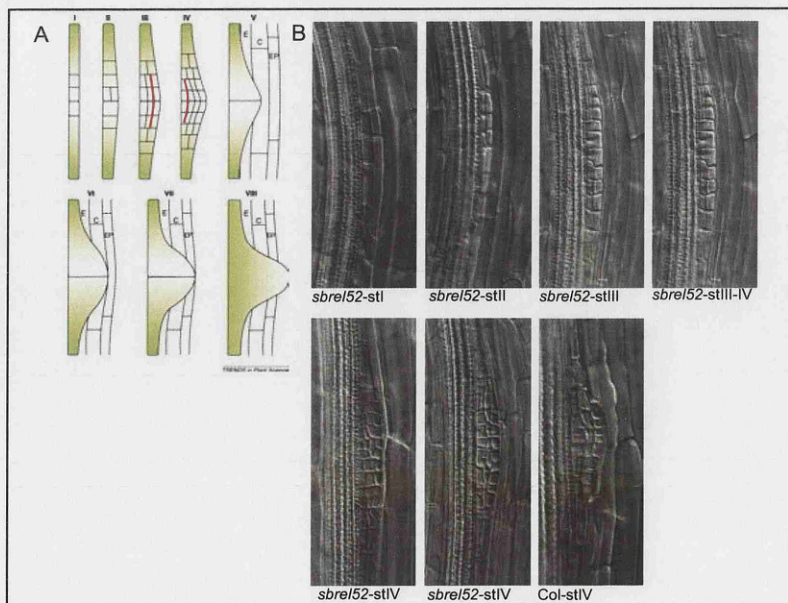


Figura 37. Los primordios de *sbrel52* tienen un patrón de división celular alterado. A) Representación esquemática del proceso de división celular de un primordio. B) Fotografías de primordios de *sbrel52* a distintos estadios de desarrollo. Las fotos fueron tomadas con microscopio Normarski.

Para analizar si había alguna alteración en la identidad de algunas capas celulares en la raíz o en la respuesta a auxina realizamos cruces del mutante *sbrel52* con marcadores de fluorescencia de raíz como DR5:GFP (Fig. 38A) y SCR:GFP (Fig. 38B) (Heidstra *et al.*, 2004). Se observa un patrón de expresión similar en los dos marcadores en el mutante *sbrel52* con respecto al silvestre aunque la intensidad de expresión es menor en el mutante.

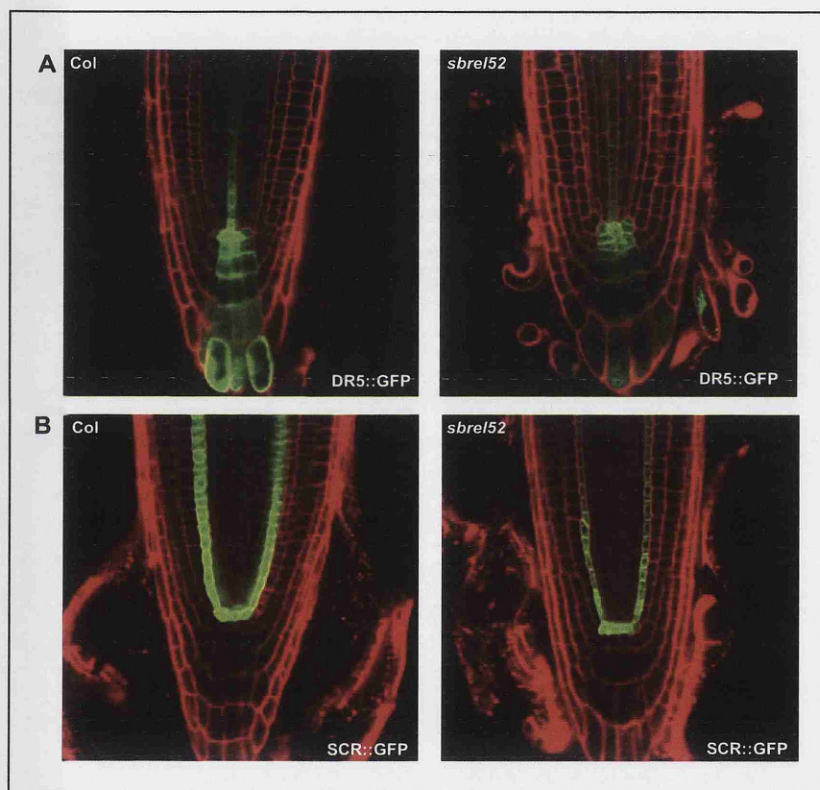


Figura 38. La expresión de diferentes marcadores GFP de la raíz no está alterada en el mutante *sbrel52*. Fotos de microscopía confocal de plantas teñidas con yoduro de propidio. A) Plantas DR5:GFP y *sbrel52*/DR5:GFP. B) Plantas SCR:GFP y *sbrel52*/SCR:GFP.

5.5.1.2 Mapeo del mutante *sbrel52*

Para el mapeo de la mutación en el mutante *sbrel52* cruzamos el mutante en fondo *Columbia* con plantas del ecotipo *Landsberg erecta*. Utilizando distintos marcadores moleculares polimórficos entre los dos ecotipos se delimitó que la mutación estaba en el cromosoma 5 comprendida entre los marcadores **MUA2** y **cer456317**. Este intervalo contiene 154

genes, analizando estos genes encontramos el gen *XBAT32* que codifica para una E3 ligasa de ubiquitina de tipo RING y para la que se había descrito por Nodzon *et al.*, (2004) su implicación en la regulación de la formación de raíces laterales. Debido a que el fenotipo del mutante *xbat32* descrito en este trabajo es similar al del mutante *sbrel52* decidimos realizar un test de alelismo entre estos dos mutantes. Como se muestra en la figura 39, la mutación de *sbrel52* y *xbat32* son mutaciones alélicas. No obstante hemos observado que la mutación *sbrel52* presenta un fenotipo más severo que el mutante descrito *xbat32* (Fig. 39).

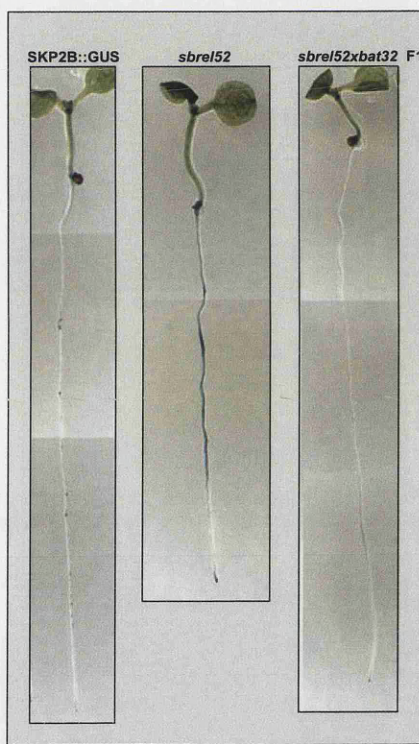


Figura 39. Prueba de alelismo de los mutantes *sbrel52* y *xbat32*. Tinción para GUS de plantas *SKP2B::GUS*, *sbrel52* y la F1 del cruce entre *sbrel52* y *xbat32*.

Para determinar la mutación responsable del fenotipo en el mutante *sbrel52* se secuenció la región genómica completa incluyendo el promotor del gen *XBAT32* en el mutante *sbrel52* y no hemos podido identificar ninguna mutación puntual producida por EMS en esta región genómica.

5.5.1.3 Actividad ubiquitina ligasa de XBAT32

En el trabajo de Nodzon *et al.*, (2004), comprobaron la actividad ubiquitina ligasa de XBAT32. Nosotros también hemos generado una proteína recombinante MBP-XBAT32 (Maltosa Binding Protein) que muestra actividad ubiquitina ligasa. Posteriormente, Prasat *et al.*, (2010) mostraron la actividad E3 ligasa de XBAT32 sobre enzimas implicadas en la biosíntesis de etileno. En nuestro trabajo nos propusimos identificar dianas adicionales de XBAT32. En la figura 40 mostramos la actividad ubiquitina ligasa de la proteína recombinante MBP-XBAT32 en concentraciones crecientes. Como control positivo utilizamos otra proteína E3 ligasa de tipo RING.

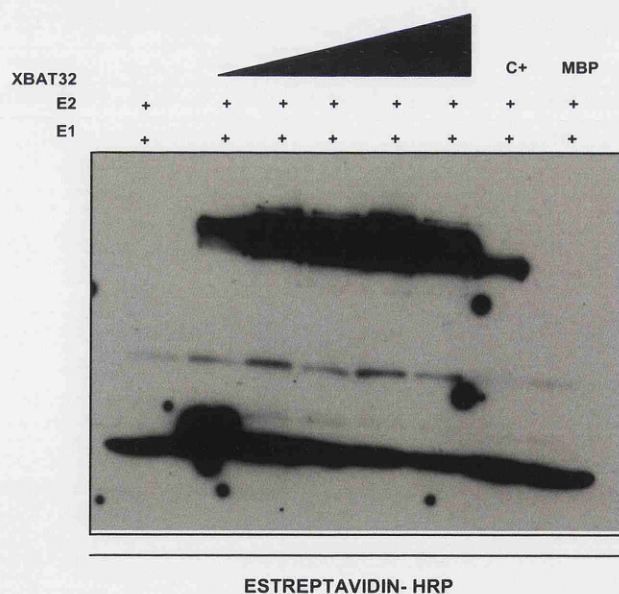


Figura 40. La enzima XBT32 tiene actividad ubiquitina ligasa *in vitro*. Ensayo de ubiquitinación *in vitro* de la proteína de fusión MBP-XBT32, con la enzima E2, UBC11 de *Arabidopsis* y la enzima E1 de humanos. Se pusieron concentraciones crecientes de MBP-XBAT32. Se utilizó como control negativo la proteína MBP y como control positivo otra enzima E3 de tipo RING para la que se había comprobado su actividad ubiquitina ligasa previamente.

5.5.1.4 Identificación de proteínas diana de XBAT32

Una vez que comprobamos la actividad ubiquitina ligasa de la enzima XBAT32 nos planteamos la identificación de posibles proteínas diana utilizando la técnica de doble híbrido de levaduras. Para ello, se clonó la proteína XBAT32 en el vector de levaduras pDEST32 y se cotransformó en la cepa HF7C con una librería de ADNcs de plántulas de *Arabidopsis* de 5 días. La transformación se seleccionó para la auxotrofia de Histidina. De una primera búsqueda en casi 2 millones de transformantes obtuvimos un total de 13 clones. Hicimos una segunda selección creciendo estos clones en medio con concentraciones crecientes del inhibidor 3AT (Fig. 41A) y seleccionamos los clones para los genes: *LSU3* (At3g49570), una proteína con función desconocida (AT5G32440) y que hemos denominado como *SBR1* (SBREL TARGET1) y uno de los receptores de etileno *ERS1* (AT2G40940). En el trabajo de Prasad *et al.*, (2010), describieron que la enzima E3 ligasa XBAT32 estaba implicada en la degradación de enzimas que forman parte de la ruta de biosíntesis del etileno como ACS4 y ACS7 y demostraron por experimentos *in vitro* que estas proteínas se ubiquitinaban por XBAT32.

Para verificar que la enzima XBAT32 ubiquitina a LSU3, SBR1 y ERS1 llevamos a cabo ensayos de ubiquitinación *in vitro*; como control positivo realizamos el experimento con la proteína ACS4. Para ello, generamos proteínas de fusión a GST y junto con la proteína MBP-XBAT32 se llevaron a cabo las reacciones de ubiquitinación *in vitro*. Se utilizaron los extractos crudos de bacteria que expresan las proteínas diana. Estos extractos se incubaron en una reacción de ubiquitinación durante 30 minutos con MBP-XBAT32. Posteriormente la reacción de ubiquitinación se incubó con bolas de GST para purificar las proteínas diana y separar la E3 ligasa XBAT32, reduciendo así el fondo generado por la autoubiquitinación de la E3 y la E2 utilizadas. En la reacción se utilizó ubiquitina biotinilada por lo que el western blot se reveló frente a estreptavidina-HRP (Fig. 41B).

Como se muestra en la figura 41B, XBAT32 ubiquitina *in vitro* las proteínas LSU3 y SBR1 en niveles superiores a ACS4, mientras que no pudimos detectar ubiquitinación del receptor de etileno ERS1.

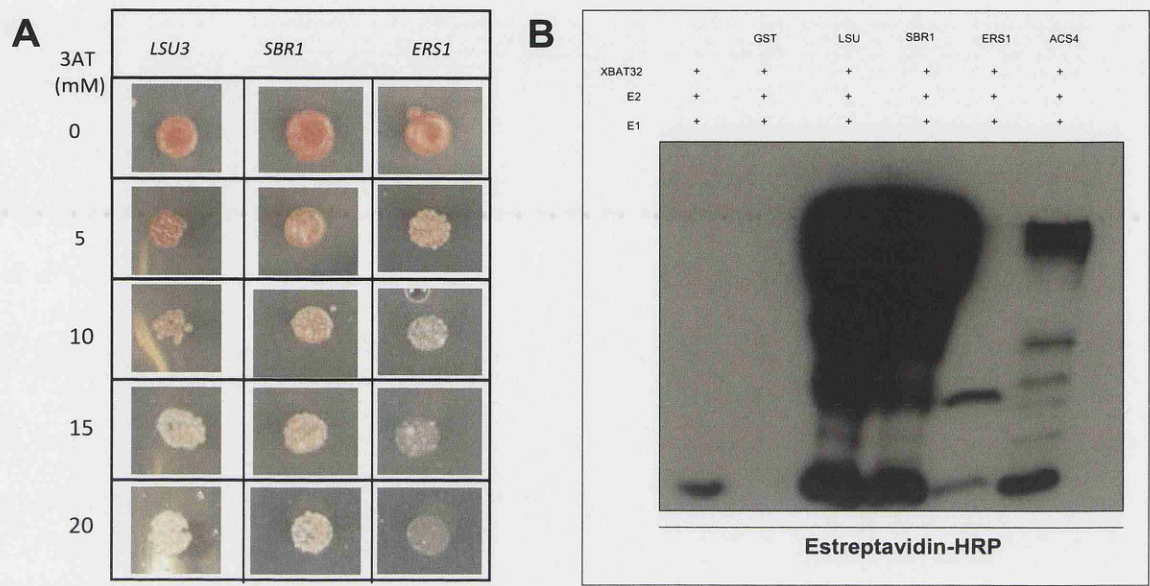


Figura 41. La proteína XBAT32 ubiquitina *in vitro* a las proteínas LSU3 y SBR1. A) Crecimiento de los clones positivos LSU3, SBR1 y ERS1 en medio sin histidina y con concentraciones crecientes del inhibidor 3AT. B) Ensayo de ubiquitinación *in vitro* de las proteínas de fusión GST-LSU, GST-SBR1, GST-ERS1 y GST-ACS4 mediado por la E3 ligasa XBAT32.

La proteína SBR1 tiene un dominio CUE y se ha descrito que estos dominios tienen función cojugadora de ubiquitina (Kang *et al.*, 2003; Shih *et al.*, 2003). Por ello, decidimos investigar si la proteína SBR1 funciona dentro de la ruta de la ubiquitina. Realizamos un ensayo de ubiquitinación *in vitro* para comprobar si podía actuar como enzima E2 o si tenía actividad E3 ubiquitina ligasa. Expresamos en bacteria la proteína GST-SBR1 y realizamos la reacción de ubiquitinación *in vitro* con el extracto crudo de bacteria. Después de cada reacción purificamos la proteína GST-SBR1 con bolas de GST. Como control se realizaron una reacción de ubiquitinación *in vitro* para XBAT32 con la proteína MBP-XBAT32 purificada (Fig. 42A carril 1) y un ensayo de ubiquitinación *in vitro* de GST-SBR1 mediado por MBP-XBAT32 (Fig. 42A carril2). Como se muestra en la figura 42A en el tercer carril, SBR1 no tiene actividad ubiquitina ligasa. Sin embargo, cuando sustituimos la enzima E2 por SBR1 en la reacción de ubiquitinación para XBAT32 (Fig. 42 carril 4), y posteriormente purificamos la proteína MBP-

XBAT32 con bolas de amilosa sí que detectamos ubiquitinación *in vitro* de XBAT32. Puesto que la enzima E1 que habíamos utilizado para las reacciones de ubiquitinación era una enzima comercial que se había purificado de células animales, para descartar cualquier contaminación con alguna E2 expresamos en bacteria la enzima E1 y utilizamos el extracto crudo para la reacción de ubiquitinación *in vitro* de XBAT32. Como se muestra en la figura 42B solo detectamos ubiquitinación *in vitro* de XBAT32 en las reacciones que contenían la E1_B (E1 expresada en bacteria), E2 y XBAT32 o reacciones con la enzima E1_C (E1 comercial) y XBAT32 lo que indicaba que la enzima E1 comercial tenía una contaminación con alguna E2. También probamos si SBR1 era capaz de unir ubiquitina por sí sola y no detectamos unión a ubiquitina (Datos no mostrados). Podemos concluir que la proteína SBR1 no es capaz de unir ubiquitina por sí sola que no tiene ni actividad E2 conjugadora de ubiquitina ni tampoco actividad E3.

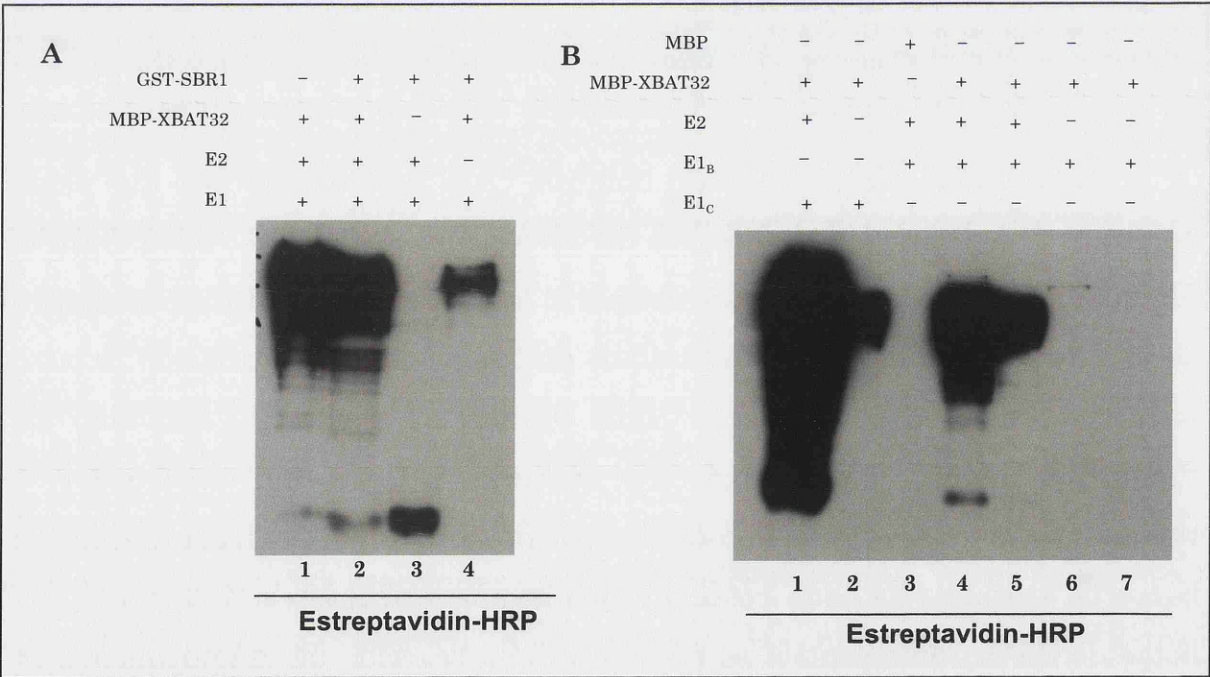


Figura 42. *SBR1 no participa en la ruta de la ubiquitina.* A) 1. Control ubiquitinación *in vitro* de XBAT32. 2. Control ubiquitinación de SBR1 mediado por XBAT32. 3. Ensayo de ubiquitinación *in vitro* de SBR1. 4. Ubiquitinación *in vitro* de XBAT32 utilizando SBR1 como una posible E2. B) 1. Control ubiquitinación *in vitro* de XBAT32 con E1_c (E1 comercial). 2. Ubiquitinación *in vitro* XBAT32 solo con E1_B (E1 expresada en bacteria). 3. Control ubiquitinación MBP con E1_B. 4. Ubiquitinación *in vitro* XBAT32 con 10µl del extracto crudo de E1_B. 5. Ubiquitinación *in vitro* XBAT32 con 20µl del extracto crudo de E1_B. 6. Ubiquitinación *in vitro* XBAT32 con 10µl del extracto crudo de E1_B y sin E2. 7. Ubiquitinación *in vitro* XBAT32 con 20µl del extracto crudo de E1_B y sin E2.

5.5.2 Mutante *sbrel50*

5.5.2.1 Caracterización fenotípica del mutante *sbrel50*

Hemos realizado una caracterización fenotípica del mutante *sbrel50* en el desarrollo de raíz comparando el mutante *sbrel50* con el control *SKP2B::GUS*. Cuando medimos el crecimiento de la raíz del mutante a distintos días encontramos que hay una parada en el crecimiento de la raíz principal al cuarto día de crecimiento. Por otro lado, hemos observado que la parte aérea en el mutante tiene un fenotipo muy similar al control (Fig. 43).

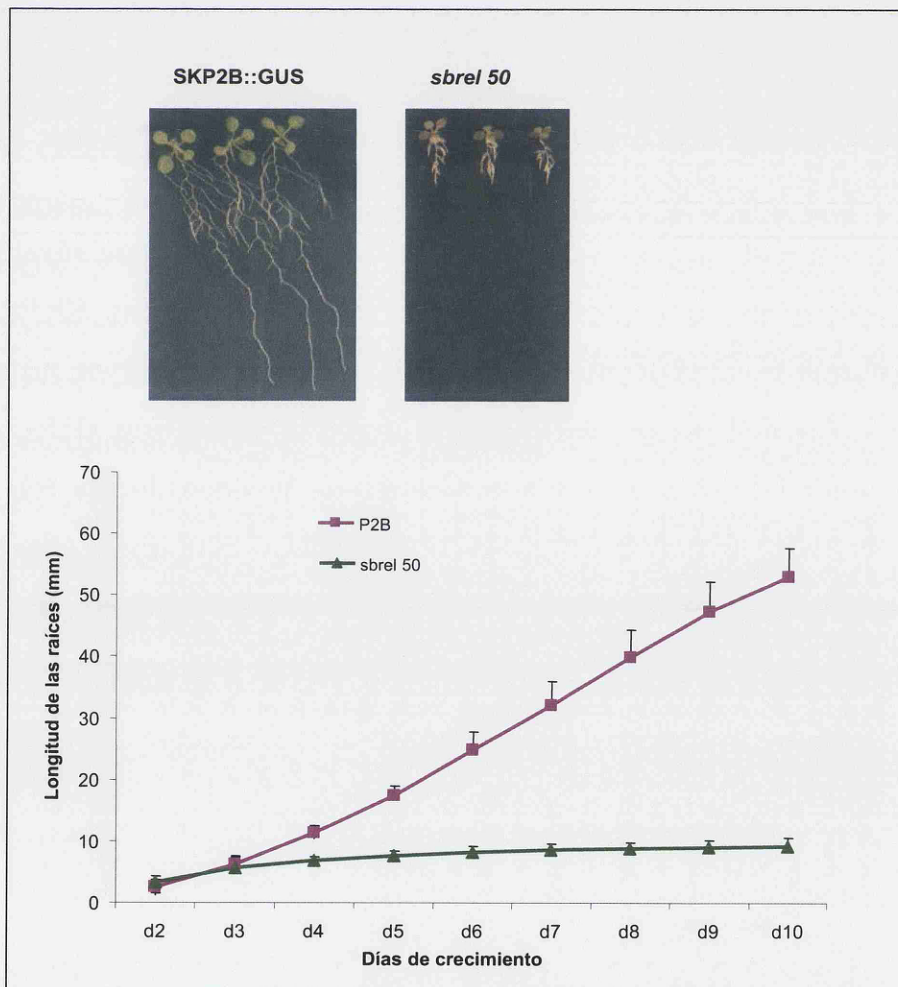


Figura 43. El mutante *sbrel50* tiene el desarrollo radicular afectado. A) Plantas control y *sbrel50* crecidas durante 10 días en medio MS. B) Medidas de longitud de raíz principal cada 24H durante 10 días de plantas control y *sbrel50* crecidas en MS.

Además, hemos contado el número de primordios por mm de raíz en plantas de 6 días con un tamaño de raíz de 30mm para el control *SKP2B:GUS* y de aproximadamente 8 mm para el mutante *sbrel50* (Fig. 44A y 44B). Hemos encontrado que el mutante *sbrel50* desarrolla un tercio más de raíces laterales por mm que las plantas control (Fig. 44B).

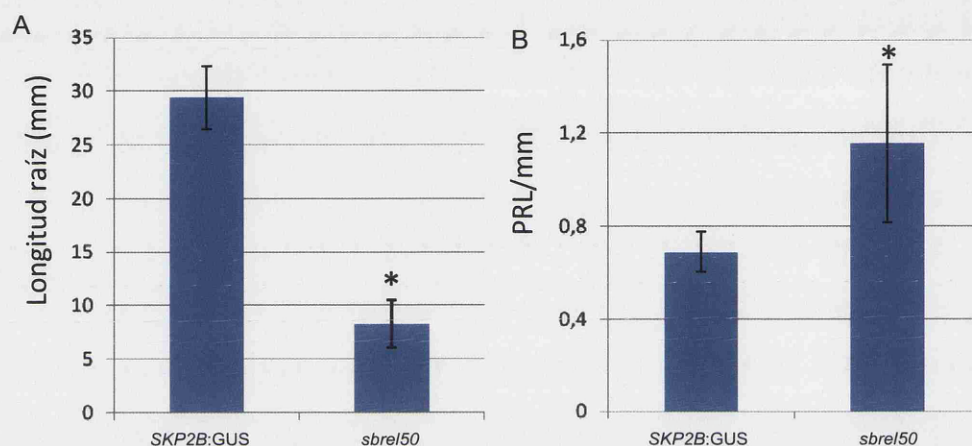


Figura 44. El mutante *sbrel50* desarrolla un mayor número de PRL. A) Medidas de la longitud de la raíz principal de plantas control *SKP2B:GUS* y plantas mutantes *sbrel50* de 6 días. B) Medidas del número de PRL/mm de plantas control *SKP2B:GUS* y plantas mutantes *sbrel50* de 6 días.

Cuando teñimos para actividad GUS plantas de 6 días de *sbrel50* (Fig. 45B) podemos observar que la expresión es similar a plantas *SKP2B:GUS* (Fig. 45A), aunque en el mutante *sbrel50* encontramos un mayor número de RL emergidas. Además se puede visualizar, por la expresión GUS, que en *sbrel50* se forman RL terciarias directamente de la base de las RL que se originan de la raíz primaria (Fig. 45B). También, podemos observar la existencia de una aceleración en el desarrollo de RL aunque con el paso del tiempo quedan arrestadas en el crecimiento al igual que ocurre con la raíz principal.

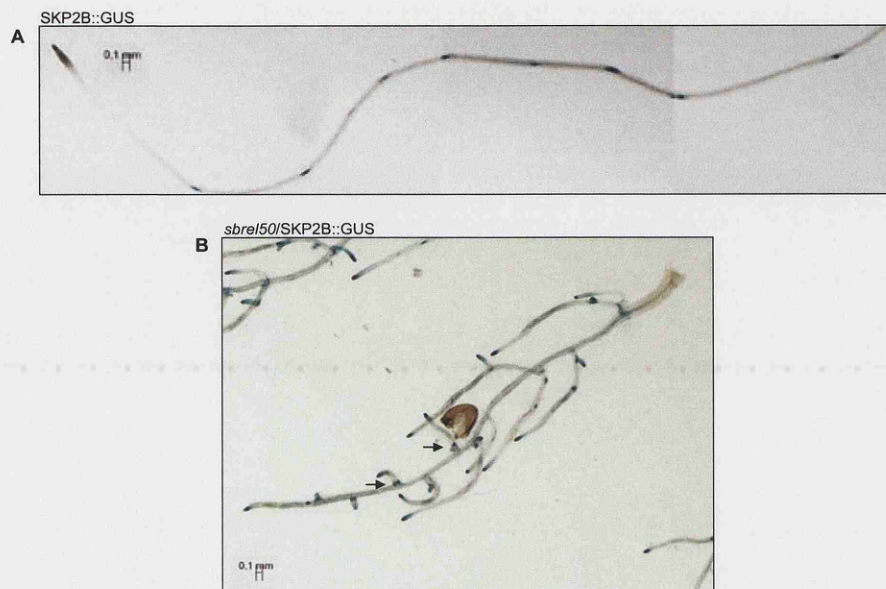


Figura 45. El mutante *sbrel50* desarrolla un mayor número de RL. A) Tinción para GUS de plantas *SKP2B::GUS* de 6 días. B) Tinción para GUS de plantas *sbrel50/SKP2B::GUS* de 6 días. Las flechas indican la zona basal de las raíces laterales donde se están desarrollando PRL.

Al crecer este mutante en placas en vertical, y poner dos alturas de plantas apreciamos que las raíces de las plantas en la parte inferior crecían significativa y reproduciblemente más que las de la parte superior. Esto se podría explicar porque en la parte inferior se recibe una menor cantidad de luz. Por ello, para comprobar si había algún efecto en el mutante *sbrel50* al crecerlo en distintas condiciones de luz (visible, azul, verde, amarilla, y roja) (Fig. 46A) y en oscuridad, se crecieron plantas *sbrel50* y control durante 7 días en estas condiciones. Sorprendentemente, encontramos que hay una recuperación total del fenotipo del mutante conforme nos acercamos en el espectro a luz roja (Fig. 46C, 46D, 46E y 46F) o cuando se crecen en oscuridad (Fig. 46G).

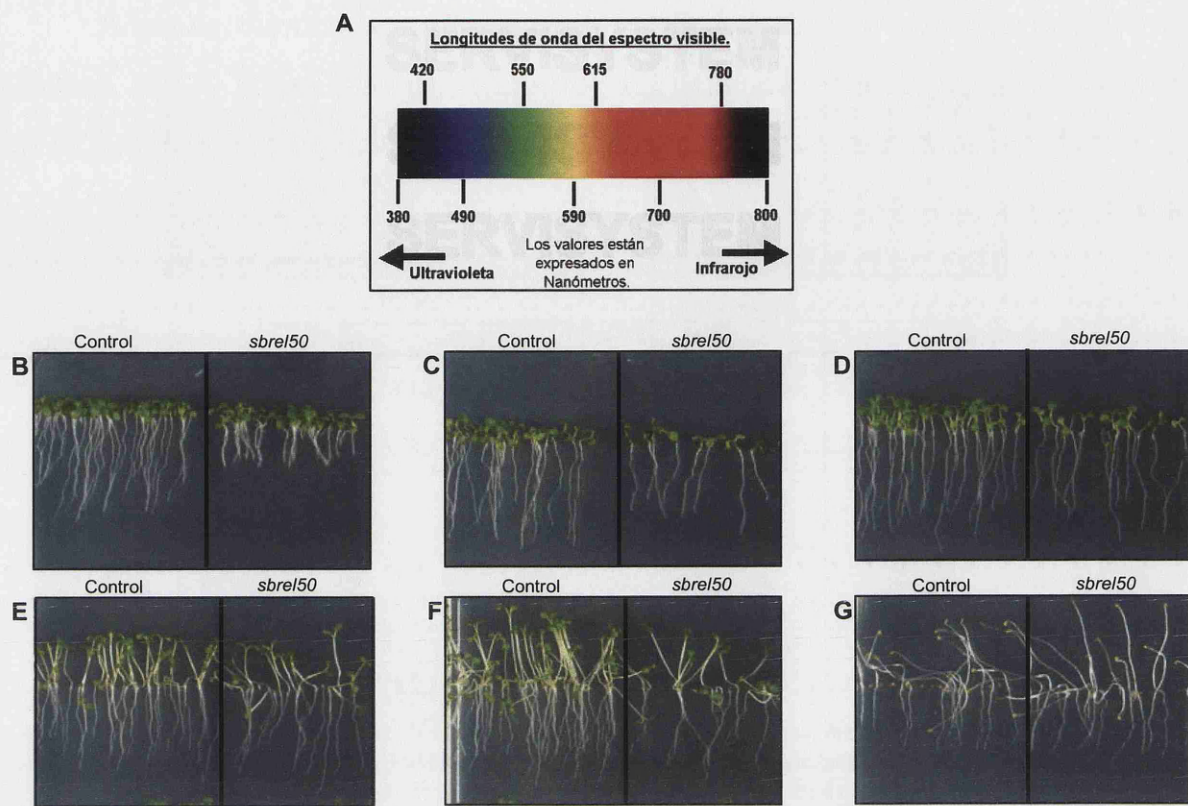


Figura 46. El mutante *sbrel50* recupera el fenotipo en distintas condiciones de luz y oscuridad. Crecimiento de plantas mutantes *sbrel50* y plantas control en MS y en distintas condiciones de luz y oscuridad. A) Esquema de las longitudes de onda dentro del espectro de luz visible. B) Plantas control y *sbrel50* crecidas durante 7 días en medio MS. C) Plantas control y *sbrel50* crecidas durante 7 días en medio MS y luz azul. D) Plantas control y *sbrel50* crecidas durante 7 días en medio MS y luz verde. E) Plantas control y *sbrel50* crecidas durante 7 días en medio MS y luz amarilla. F) Plantas control y *sbrel50* crecidas durante 7 días en medio MS y luz roja. G) Plantas control y *sbrel50* crecidas durante 7 días en medio MS y oscuridad.

También cuantificamos la longitud de la raíz principal de plantas control *SKP2B:GUS* y plantas mutantes *sbrel50* en las distintas condiciones de luz y oscuridad. Para ello, crecimos plantas durante 6 días en medio MS en luz visible, azul, verde, amarilla, roja y en oscuridad. Como podemos observar en la figura 47A el mutante *sbrel50* recupera el crecimiento en la raíz principal con respecto al crecimiento en luz natural en las distintas condiciones de luz y en oscuridad. Además, en el caso del crecimiento *sbrel50* en condiciones de luz verde y roja el tamaño de la raíz principal es significativamente mayor que el crecimiento de plantas control (Fig. 47A). Si representamos el crecimiento de *sbrel50* con respecto al crecimiento de las plantas control (Fig. 47B) observamos una recuperación del 120% en el caso del crecimiento en luz verde y de casi el 110% en el crecimiento en luz roja.

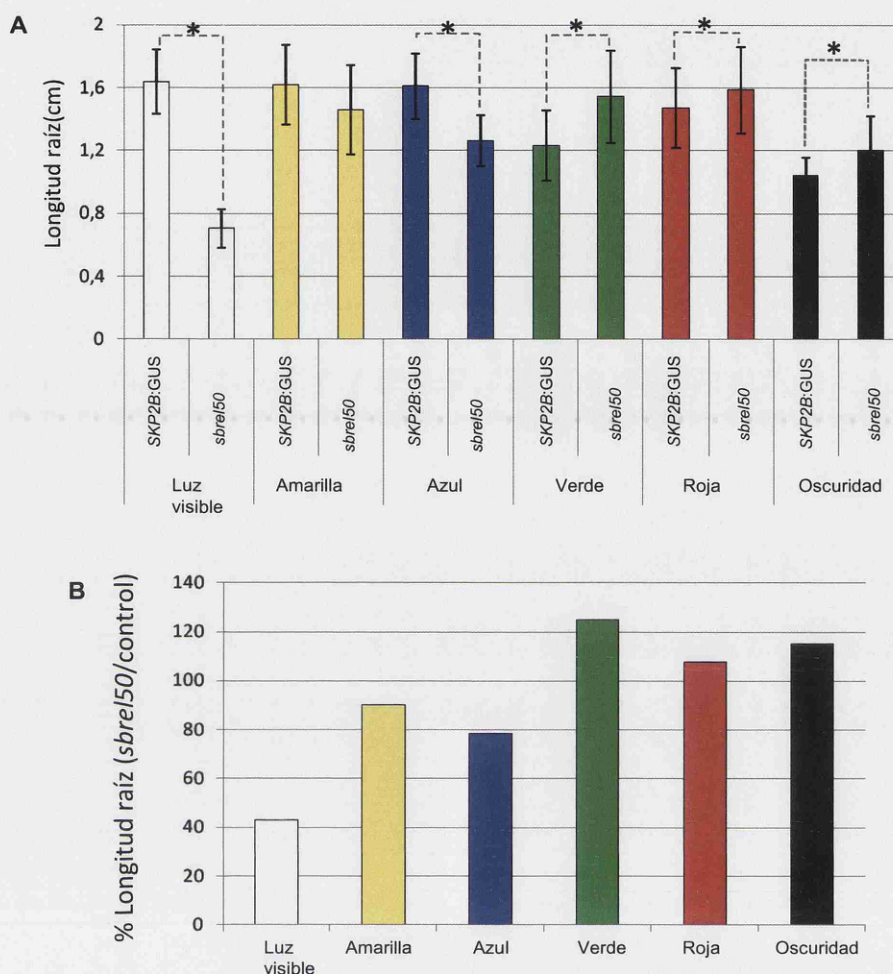


Figura 47. El mutante *sbrel50* desarrolla raíces más largas que el control en ciertas condiciones de luz. A) Medidas de la longitud de la raíz principal de plantas *SKP2B:GUS* y plantas mutantes *sbrel50* crecidas en luz visible, amarilla, azul, verde, roja y en oscuridad durante 6 días. B) Medidas del % de crecimiento de la raíz del mutante *sbrel50* con respecto al control.

5.5.2.2 Expresión de marcadores de raíz en el mutante *sbrel 50*

Para analizar si en el mutante *sbrel50* había alguna alteración en la identidad celular en algunas capas de la raíz realizamos cruces del mutante con distintos marcadores celulares en el meristemo principal de la raíz. Analizamos plantas de 5 días crecidas en MS y observamos que la expresión de marcadores específicos de centro quiescente como QC46 (Fig. 48A), SCR (Fig. 48D), WOX5 (Fig. 48E) (Sabatini *et al.*, 2003 ; Haecker *et al.*, 2004; Heidstra *et al.*, 2004) muestran que la identidad celular del centro quiescente se mantiene en el mutante *sbrel50*, sin embargo se aprecian alteraciones en las divisiones celulares de las células de la columnela. En el

caso del marcador de células del córtex Co2H2B:YFP (Fig. 48B) (Ten Hove *et al.*, 2010) no encontramos ninguna alteración en su expresión en el fondo mutante *sbrel50*. En el caso del marcador de respuesta a auxina DR5:GFP (Fig. 48C) no encontramos ninguna alteración en su expresión aunque la intensidad en la expresión es mayor.

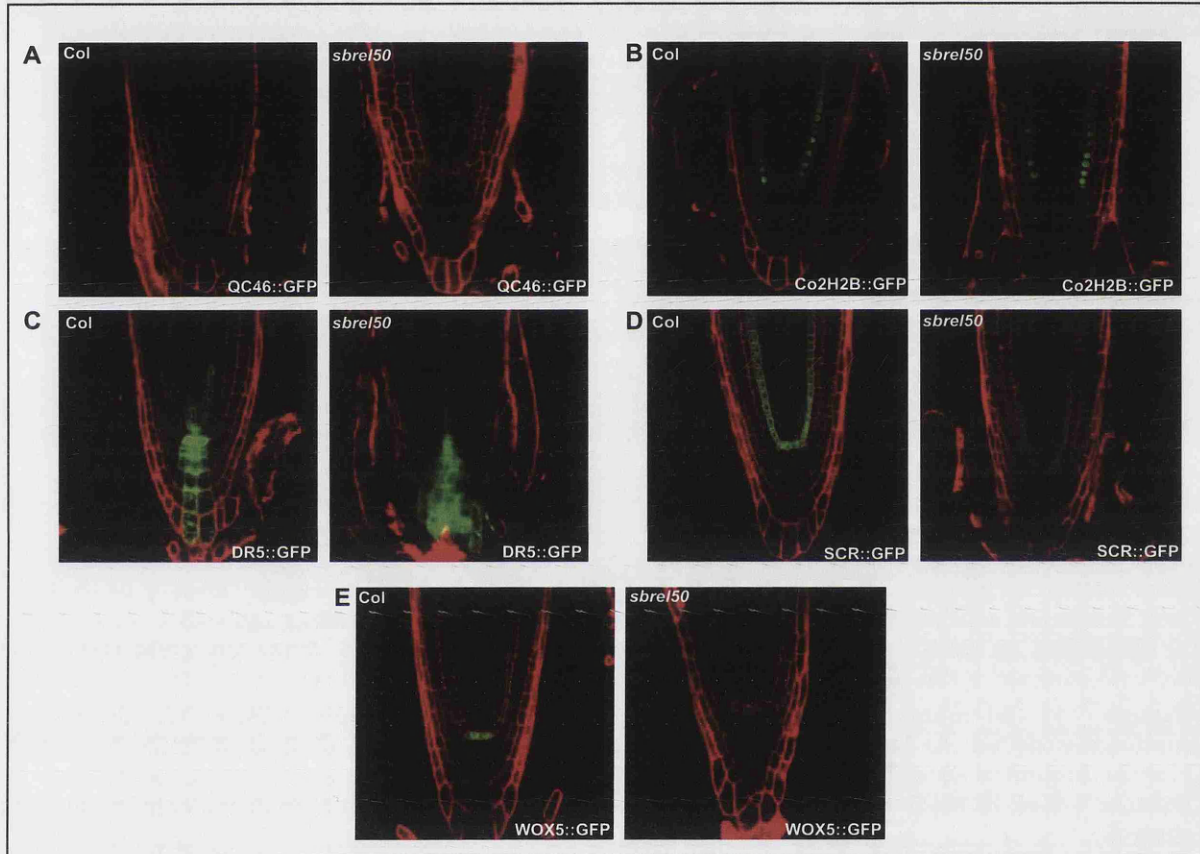


Figura 48. La expresión de algunos marcadores de raíz está afectada en el mutante *sbrel50*. Fotos de microscopia confocal de plantas teñidas con ioduro de propidio. A) Plantas QC46:GFP y *sbrel50*/QC46:GFP. B) Plantas Co2:YFP y Co2:YFP/*sbrel50* se hicieron fotos con filtro para GFP. C) Plantas DR5:GFP y DR5:GFP/*sbrel50*. D) Plantas SCR:GFP y *sbrel50*/SCR:GFP. E) Plantas WOX5:GFP y *sbrel50*/WOX5:GFP.

5.5.2.3 Mapeo del mutante *sbrel50*

Para el mapeo de la mutación en el mutante *sbrel50* cruzamos el mutante en fondo Columbia con plantas del ecotipo *Landsbreg erecta*. Utilizando distintos marcadores moleculares polimórficos entre los dos ecotipos se delimitó que la mutación estaba en el cromosoma 2 comprendida entre los marcadores **CER460723** y **CER451608**. En la región delimitada

por estos dos marcadores encontramos un total de 40 genes. Hasta la fecha hemos secuenciado la región genómica de 10 posibles candidatos (Anexo 1 Tabla 4) que pudieran explicar el fenotipo observado, y no hemos sido capaces de encontrar una mutación puntual. La siguiente estrategia para la identificación de la mutación responsable del fenotipo del mutante *sbrel50* será una secuenciación del genoma completo del mutante y la búsqueda de posibles polimorfismos en el intervalo que hemos delimitado por mapeo cartográfico.



DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

La formación de RL es un proceso clave para el desarrollo de la arquitectura radicular. El grado de ramificación de las raíces tiene un impacto directo en la eficiencia de absorción de agua, adquisición de nutrientes y el anclaje de las plantas al suelo. La comprensión de la regulación del desarrollo de raíces laterales es por tanto de gran importancia agronómica. Nuestra comprensión del desarrollo de RL ha avanzado mucho en los últimos 5 años. La mayoría de estudios de las bases moleculares y celulares de la formación de RL se han estudiado en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. En este tiempo se ha realizado un gran progreso en la identificación de genes que regulan tanto la iniciación de las RL, la distribución a lo largo de la raíz principal como el proceso de emergencia del primordio.

En este trabajo hemos identificado un nuevo marcador del desarrollo de RL, el gen *SKP2B*, que se expresa en las células fundadoras y en todos los estadios de formación del primordio. Además, hemos caracterizado el mutante *skp2b* y hemos observado que tiene afectado el desarrollo del sistema radicular. Por otro lado, la identificación del marcador *SKP2B* nos ha permitido la identificación de gran número de genes potencialmente implicados en el desarrollo de RL. También hemos podido avanzar en la comprensión del control de la regulación epigenética del desarrollo radicular.

SKP2B y ciclo celular

En la raíz de *Arabidopsis* tienen lugar tres tipos principales de crecimiento. Por un lado, el crecimiento longitudinal que deriva del crecimiento de las células que se producen por división celular del meristemo radicular primario, por otro lado un crecimiento radial de la actividad del cambium que permite un engrosamiento de la raíz madura y

finalmente, la ramificación de la raíz que es el resultado de la división de las células del periciclo próximas al xilema para dar lugar a las RL. Las RL se marcan en las células del periciclo dentro de la región del meristemo principal donde las divisiones celulares se están desacelerando y está aumentando el tamaño celular, ésta zona se ha denominado “meristemo basal”. Además el marcaje de estas células responde a fluctuaciones de auxina y expresión génica en este meristemo basal (De Smet *et al.*, 2007; Nieuwland *et al.*, 2009; De Rybel *et al.*, 2010; Moreno-Risueno *et al.*, 2010). Posteriormente, se requiere una segunda señal dependiente de auxina para activar el desarrollo de las células marcadas en el meristemo basal (Péret *et al.*, 2009). Además, se puede inducir la formación de RL por la creación de un máximo de auxina en raíces dobladas de forma mecánica o por señales dependientes de la gravedad (Ditengou *et al.*, 2008; Laskowski *et al.*, 2008; Richter *et al.*, 2009).

Estos datos implican que tejidos específicos fuera de la zona de división del meristemo principal mantengan la capacidad de responder a señales mitogénicas que inducen la división celular. En el caso de la formación de las RL la señal más importante es la auxina (Fukaki *et al.*, 2002; De Smet *et al.*, 2007; Okushima *et al.*, 2007; Laskowski *et al.*, 2008), que en última instancia incide en el control de la división celular. A pesar de que se han realizado estudios transcriptómicos de raíces de *Arabidopsis* utilizando un sistema de sincronización de la formación de RL (Himanen *et al.*, 2002, 2004) los mecanismos moleculares, desde el punto de vista del ciclo celular, que permiten a las células del periciclo responder a la señalización mediada por auxina, potenciar el marcaje de las células fundadoras y las consiguientes divisiones celulares son parcialmente desconocidos. En *Arabidopsis* se han descrito junto dos proteínas con alta homología a *skp2* de humanos SKP2A y SKP2B (Del Pozo *et al.*, 2002). La proteína SKP2A tiene una homología del 83% con la proteína SKP2B. Se ha descrito la implicación de SKP2A, pero no SKP2B, en la degradación de los factores transcripcionales E2F/DPB que están implicados en el control de la división

celular (del Pozo *et al.*, 2002; del Pozo *et al.*, 2006). También se ha implicado a SKP2A como un regulador positivo del ciclo celular ya que plantas que sobreexpresan este gen tienen mayor tamaño, desarrollan mayor número de primordios de RL y tienen aumentada la expresión del marcador de auxina *DR5:GUS* y del marcador de división celular *CYCB1;1:GUS* (Jurado *et al.*, 2008). Estos resultados permiten situar al gen *SKP2A* como un regulador positivo del ciclo celular y establecer una conexión entre un regulador de ciclo celular y la respuesta a auxina. Nuestros resultados indican que SKP2B parece tener un papel opuesto en la regulación del ciclo celular, ya que plantas mutantes *skp2a* tienen reducida la expresión del marcador *CYCB1;1:GUS* (Jurado *et al.*, 2010) a diferencia de lo que ocurre en el mutante *skp2b* donde hemos encontrado un aumento en la expresión de este marcador. Asimismo, mutaciones en *SKP2B* favorecen la división de las CF en el periciclo. En conjunto, estos datos indican que *SKP2B* es un regulador negativo de la división celular.

También, hemos encontrado un comportamiento opuesto entre *SKP2A* y *SKP2B* en la regulación de la respuesta a auxina. En plantas silvestres que expresan el marcador *DR5:GUS* se pueden encontrar primordios sin expresión *GUS* lo que indica que quedan bloqueados en su desarrollo (Benkova *et al.*, 2003; De Smet *et al.*, 2003; Zolla *et al.*, 2010). Nuestros resultados del análisis del mutante *skp2b* han mostrado que esta mutación favorece que casi todos los PRL expresen *DR5:GUS*. Este resultado sugiere que en el mutante *skp2b* se previene la parada en el desarrollo de algunos de los primordios que tiene lugar en plantas silvestres. Hasta la fecha, se ha demostrado que el promotor *DR5* es el marcador más temprano de las células fundadoras del periciclo y que la activación de este promotor se correlaciona absolutamente con el desarrollo del primordio (Dubrovsky *et al.*, 2008). Además, estos autores proporcionaron evidencias que sugieren que la actividad del promotor *DR5* no refleja una elevada sensibilidad a la señalización mediada por auxina, pero sí al incremento de los niveles de auxina en las células. En el futuro, sería interesante comprobar la expresión

del marcador *DR5:GUS* en un fondo doble mutante para *skp2b* y para el transportador de auxina *aux1* (Bennett *et al.*, 1996). El gen *AUX1* codifica para una proteína de membrana similar a una permeasa, que funciona como un transportador de influjo de auxina y se ha descrito su implicación durante el desarrollo del primordio facilitando su crecimiento mediante el transporte de auxina desde la parte aérea (Marchant *et al.*, 2002). Con este resultado se podría resolver la pregunta de si el aumento de expresión del marcador DR5 en primordios de *skp2b* se debe a que como se está promoviendo la división celular, esto conlleve un incremento en la respuesta a auxina, o a que hay un aumento en los niveles de auxina en los PRL. Por otro lado, puesto que se han descrito compuestos químicos que actúan bloqueando específicamente al receptor de auxina TIR1 y que actúan por tanto como inhibidores de la señalización de auxina (Hayashi *et al.*, 2008), sería interesante crecer plantas *skp2b/DR5:GUS* en medio con un inhibidor de la unión a auxina al receptor TIR1 y comprobar la expresión del marcador DR5 en el fondo mutante *skp2b*.

También parecen tener un papel opuesto *SKP2A* y *SKP2B* en la capacidad de unir auxina, ya que sólo *SKP2A* une esta hormona (Jurado *et al.*, 2010). Comparando las secuencias de las dos proteínas y los posibles residuos implicados en la unión a auxina sólo la leucina en posición 128 difiere entre *SKP2A* y *SKP2B*. Al realizar una mutagénesis puntual en *SKP2A* de la Leucina en posición 128 por una Serina (Residuo que aparece en *SKP2B* en la misma posición) la capacidad de unión a auxina de *SKP2A* se ve mermada en un 60% (Jurado *et al.*, 2010). Sin embargo, cuando cambiamos en la proteína *SKP2B* la serina 128 por una leucina aumenta la capacidad de unión a auxina de *SKP2B*. No obstante, no se podría descartar que *in vivo* *SKP2B* sea capaz de unir auxina y que se necesite una modificación posttraduccional del residuo de serina 128, que favoreciera la unión a la hormona.

Por otro lado, se ha descrito que en la activación de las células del periciclo parecen estar implicados cambios en los niveles de una proteína inhibidora de ciclo celular KRP2 (Himanen *et al.*, 2002). El gen *KRP2* se expresa en las células del periciclo y se regula negativamente en condiciones inductoras de la formación de RL. Basándose en estos resultados, se propuso que *KRP2* controla la transición de G1 a S del ciclo celular durante la activación de las células del periciclo. En el trabajo de Ren y col., (2008) se demostró que la sobreexpresión de KRP1 inhibe la división de las células del periciclo mediada por auxina resultando en una reducción significativa del número de RL. Estos resultados sugerían una posible implicación de KRP1 en la regulación de la activación de las células del periciclo. Por otro lado, vieron que la regulación de KRP1 parecía llevarse a cabo a nivel de proteína en una regulación mediada por la ruta de la ubiquitina. Basándose en los resultados publicados para *Skp2* de humanos (Carrano *et al.*, 1999; Kamura *et al.*, 2004b; Sutterluty *et al.*, 1999) demostraron que *SKP2B* junto con otra enzima E3 de tipo RING, *RKP* estaban implicadas en la degradación específica de KRP1 (Ren *et al.*, 2008). Esto parece contradecir nuestros resultados que sitúan a *SKP2B* como un inhibidor del ciclo celular ya que *KRP1* es un inhibidor de la división celular. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que en las células del periciclo, al menos, *SKP2B* promueva la degradación de otras proteínas con función positiva en la proliferación de las células fundadoras. Además, el análisis del fenotipo del doble mutante *skp2brkp* muestra que hay un mayor número de primordios emergidos en comparación con los mutantes simples *skp2b* y *rkp*. Este resultado podría explicarse si pensamos que en el doble mutante se esté favoreciendo el desarrollo de los primordios que se acumulan en estadio I y II en plantas *skp2b*, por lo que *SKP2B* estaría regulando a proteínas implicadas positivamente en el marcaje y la iniciación de las primeras divisiones del primordio y *RKP* estaría controlando la estabilidad de proteínas implicadas positivamente en el desarrollo del primordio en estadios más avanzados (Estadios III-VII).

En el trabajo de Jurado y col., (2008) se demostró por primera vez en plantas la actividad ubiquitina ligasa de un complejo SCF, el complejo SCF^{SKP2A}. En este trabajo hemos comprobado que SKP2B interacciona por doble híbrido con ASK1 y ASK2 pero no hemos podido generar una línea sobreexpresora estable de SKP2B fusionada a un epítipo que habría permitido comprobar la actividad ubiquitina ligasa *in vitro-in vivo* del complejo SCF^{SKP2B}.

SKP2B como un marcador del desarrollo de raíces laterales

Hasta ahora, el marcador de respuesta a auxina DR5:GUS o DR5:GFP ha sido el marcador más utilizado asociado al inicio del desarrollo de RL y posterior desarrollo del primordio teniendo en cuenta el papel principal de la auxina en la regulación del desarrollo de RL (Benkova *et al.*, 2003; Dubrovsky *et al.*, 2008). Sin embargo, este marcador es un marcador sintético que consiste en repeticiones consecutivas de 11pb que incluyen el motivo de respuesta a auxina TGTCTC (Ulmasov *et al.*, 1997), no pudiendo representar este motivo el contexto o los elementos reguladores implicados tanto en la iniciación y en la formación de RL como elementos de regulación hormonal o regiones reguladas mediante marcas epigenéticas. Se ha mostrado en algunos trabajos previos que la tinción GUS de la línea DR5:GUS no se da en todos los primordios de una misma planta sugiriendo que algunos quedan bloqueados en su desarrollo (Benkova *et al.*, 2003; De Smet *et al.*, 2003, Zolla *et al.*, 2010). Como se describió en el trabajo de Zolla y col., (2010) algunos de estos primordios que quedan arrestados se reactivan bajo condiciones de estrés. En nuestro trabajo hemos mostrado que la expresión de *SKP2B* se da en todos los primordios y células fundadoras, así como durante todos los estadios de formación del primordio y a lo largo del desarrollo indicando que es un marcador excelente del número total de primordios en la raíz, es decir, del potencial de desarrollo del sistema radicular.

En este trabajo hemos mostrado que el promotor de *SKP2B* conduce específicamente la expresión GUS a las células fundadoras y los PRL. La expresión de un gen con efecto tóxico (BARNASA) bajo el control del fragmento del promotor de *SKP2B* que dirige la expresión en los PIRL reduce significativamente el número de RL emergidas, por lo que este sistema parece ser útil para la expresión específica de genes en las células fundadoras y en los PRL y para el diseño de distintos tipos de arquitecturas de raíz. Además hemos expresado bajo el promotor 0.5Kb*SKP2B* dos variantes alélicas del gen *IAA14*, una variante que codifica para una proteína mutante mIAA14 que tiene un fuerte efecto de inhibición de la formación de RL ya que no es degradada vía TIR1 y la proteína silvestre *IAA14* (Fukaki *et al.*, 2002). Se describió que la expresión ectópica de la proteína mutante mIAA14 bajo un sistema inducible con dexametasona y efectuando la inducción de la expresión de forma postembriónica, producía un desarrollo anormal de la formación de RL (Fukaki *et al.*, 2005). En este trabajo utilizaron para expresar la variante mIAA14 el promotor del gen *SHR*, que es específico de la zona vascular de la raíz, el del promotor *SCR* que en desarrollo postembriónico se expresa, entre otros tejidos de la raíz, en un linaje celular específico durante el desarrollo del primordio y los promotores de los factores de transcripción directamente implicados en la respuesta a auxina en la formación del primordio *ARF7* y *ARF19*. Estos autores concluyeron que la expresión específica de tejido de la proteína mIAA14 permitía la identificación de las células importantes para el desarrollo de RL. En nuestro trabajo hemos demostrado que la expresión tanto de la proteína mutante como de la silvestre reduce el número de RL aunque no bloquea totalmente la formación de las mismas tal y como se ha publicado utilizando otros promotores (Fukaki *et al.*, 2005). Hay que destacar que el que se comporten igual las líneas que expresan la proteína mIAA14 y líneas que expresan la proteína silvestre *IAA14*, puede deberse a que aunque haya solapamiento de tejidos donde se esta expresando *IAA14* bajo su promotor y donde se expresa con el promotor de *SKP2B* debe haber diferencias a nivel de la transcripción que hagan que los niveles de

transcripción sean más elevados bajo el promotor de 0.5Kb del gen *SKP2B* que los niveles controlados por el promotor de *IAA14* y por tanto, que los niveles de proteína no sean regulados totalmente por TIR1 a pesar de que se ha descrito que la expresión de *TIR1* se da en primordios en desarrollo (Gray *et al.*, 1999). Esto podría explicar que no hayamos encontrado una inhibición total del desarrollo de primordios aunque sí una reducción considerable. Basándonos en estos resultados podemos concluir que el promotor de 0.5Kb de *SKP2B* puede tener un uso biotecnológico para modificar el sistema radicular de plantas.

Por otro lado, la posibilidad de dirigir la expresión génica de forma que sea específica de tejido es un factor limitante en la biotecnología. En muchos casos, la expresión en tejidos no deseados conlleva efectos negativos. La identificación de promotores específicos de raíz puede ser importante para la mejora y el crecimiento de las plantas en condiciones de estrés como sequía o salinidad. Estos promotores de raíz permiten la expresión específica de genes que confieren tanto tolerancia a estreses ambientales como la modificación de la arquitectura de la raíz por lo que se podría incrementar la absorción de nutrientes y la mejora de la productividad. Utilizando aproximaciones genéticas se han descrito varios motivos específicos de raíz. Recientemente, la búsqueda de “Ds-element enhancer trap lines” en *Arabidopsis* ha permitido la identificación de un promotor específico de raíz (*At1g73160*) (Vijaybhaskar *et al.*, 2008). Podemos destacar que el promotor de este gen incluye al menos 1 copia del elemento que hemos descrito como específico de RL (Tabla 2) con un sólo cambio de base. Hemos realizado una búsqueda *in silico* de promotores que contienen el dominio específico de raíz de *SKP2B* permitiendo un sólo cambio en una base, y ésta búsqueda nos ha permitido la identificación de más de 500 genes (Datos no mostrados). También hemos utilizado un atlas virtual de expresión (Winter *et al.*, 2007; Brady *et al.*, 2007) (Datos no mostrados) que muestra que muchos de los genes identificados se expresan en raíz. Estos datos junto con el hecho de que la mutación en el motivo del promotor de *SKP2B* anula su expresión en

los PIRL, nos permite concluir que este motivo es importante para conferir la expresión específica en la raíz. Además, el patrón de expresión de *SKP2B* está conservado en otras especies como tomate o patata (Datos no mostrados). Nuestros resultados sugieren que posiblemente esta expresión en raíz esté conservada en la evolución de las plantas.

En este trabajo hemos descrito que *SKP2B* se expresa específicamente en las células fundadoras, durante todos los estadios de formación del primordio y su expresión responde a auxina, por ello, decidimos analizar la expresión de *SKP2B* en fondos mutantes de genes implicados en la señalización mediada por auxina. Se ha descrito recientemente que el módulo de respuesta a auxina mediado por *IAA28* está implicado en el marcaje de las células fundadoras en el meristemo basal (De Rybel *et al.*, 2010) y que el módulo *IAA14/SLR1* regula la primera división celular asimétrica de las células fundadoras y el posterior desarrollo de la raíz lateral (Fig. 3). Mutantes de ganancia de función como *IAA14/SLR1 (slr1)* bloquean casi completamente la formación de RL. En este trabajo hemos comprobado que en el mutante *slr1* no hay expresión en las células fundadoras mientras que la expresión está ligeramente aumentada en el meristemo principal. El tratamiento con auxina no induce la formación de RL en el mutante *slr1* (Fukaki *et al.*, 2006), sin embargo, nuestros datos muestran que el tratamiento con auxina es capaz de producir la especificación de las células fundadoras en el mutante *slr1* (Fig. 28) aunque esas células no son capaces de desarrollar un primordio de RL. Por otro lado, el mutante *iaa28* tiene reducido significativamente el número de primordios donde *SKP2B* se está expresando lo que se correlaciona con la reducción del número de RL observada en el mutante.

También hemos encontrado que otros mutantes implicados en la señalización de auxina como *axr1-12* o *tir1* reducen el número de RL y por tanto, la expresión de *SKP2B*. Sorprendentemente, mutaciones en el gen *IBR5*, una fosfatasa que se ha implicado en la señalización de auxina

independiente de la ruta de señalización mediada por TIR1 (Monroe-Augustus *et al.*, 2003), no reduce el número de primordios con expresión GUS en la línea *ibr5/SKP2B::GUS*. Estos resultados sugieren que *IBR5* no se requiere para la especificación de las células fundadoras pero sí es necesario para el desarrollo y la emergencia del primordio.

Al contrario que la auxina el tratamiento con ABA reduce el número de RL (De Smet *et al.*, 2003). El análisis de la expresión de *SKP2B* en el tratamiento con ABA muestra una inducción de la expresión en el córtex y en las células de la epidermis de la raíz. Teniendo en cuenta el papel de *SKP2B* como represor de la división celular, es muy probable que esta proteína contribuya a bloquear cualquier tipo de proliferación y limitar el desarrollo de las RL. En trabajos previos, se había descrito que el exceso de sal reduce la actividad meristemática y el tamaño del meristemo (West *et al.*, 2004), y que a baja concentración aumenta el número de RL (He *et al.*, 2005). En este trabajo, hemos visto que altas concentraciones de sal en el medio incrementan la expresión de *SKP2B* en la zona meristemática. Esto sugiere que *SKP2B* estaría controlando la división celular en el meristemo en respuesta a estrés salino.

Regulación epigenética de la expresión de *SKP2B*

La organización de la cromatina requiere una asociación de las histonas con el ADN para formar nucleosomas. La posición y la composición de estos nucleosomas son cruciales para la dinámica de la cromatina. Las chaperonas de histonas ayudan a conducir a proteínas específicas de histonas a los puntos donde se sintetiza ADN nuevo o puntos de remodelación de cromatina. En *Arabidopsis*, se han descrito dos tipos de chaperonas de histonas que controlan la dinámica de las proteínas H3/H4 en la cromatina. Por un lado, el complejo heterotrimérico CAF-1, formado por las subunidades FAS1, FAS2 y MSI1 y por otro lado, el gen represor de histona A, HIRA. El complejo CAF-1 participa en procesos asociados a la

síntesis de ADN como replicación o reparación de ADN por la incorporación de la variante H3.1, mientras que la proteína HIRA participa en la síntesis de ADN de forma independiente de la replicación depositando la variante H3.3 (Lennox y Cohen, 1988). La histona H3.3 se ha asociado con regiones de eucromatina activa y se deposita en regiones con alta actividad transcripcional proporcionando un mecanismo de activación génica rápido y dinámico de *loci* que normalmente estarían reprimidos por modificaciones epigenéticas (Ahmad y Henikoff, 2002; Henikoff *et al.* 2004; McKittrick *et al.* 2004). De forma similar a las modificaciones covalentes de las histonas, se ha encontrado que las variantes histónicas se localizan en regiones específicas del genoma o en ciertos *loci* confiriendo características estructurales a la cromatina o modulaciones en la regulación transcripcional (Kamakaka *et al.*, 2005).

En este trabajo hemos mostrado que el promotor del gen *SKP2B* es capaz de unir la variante histónica H3.3 en ensayos de un-híbrido de levaduras. Asimismo, *in vivo*, el promotor de *SKP2B* presenta un enriquecimiento en la variante histónica H3.3, de la que se ha propuesto que su deposición mantiene un estado de la cromatina transcripcionalmente activa (Mito *et al.*, 2005) frente a la variante H3.1. También se ha descrito, en humanos, que los nucleosomas que contienen las variantes H3.3/H2A.Z marcan regiones libres de nucleosomas en promotores transcripcionalmente activos lo que facilita el acceso de factores de transcripción (Chunyuan *et al.*, 2009). Además, este enriquecimiento de H3.3 parece estar controlado por la respuesta a auxina, ya que el tratamiento con auxina aumenta los niveles de la variante H3.3 en el promotor de *SKP2B*. Hasta ahora, no hay estudios publicados en *Arabidopsis*, en los que se describa que el intercambio o el enriquecimiento de una variante histónica estén regulados hormonalmente. Estudios futuros permitirán entender a nivel molecular cómo se lleva a cabo este proceso y si otras hormonas afectan a este enriquecimiento. Además es interesante que este enriquecimiento requiera una correcta señalización mediada por IAA14 ya que no hemos encontrado enriquecimiento de H3.3 en

el mutante *iaa14/slr1*. Además, en el doble mutante *pklslr1* se revierte el fenotipo del mutante *slr1* (Fukaki *et al.*, 2006). El gen *PICKLE* codifica para una proteína implicada en procesos de remodelación de cromatina por lo que podría ser un buen punto de partida para entender cómo cambios a nivel de la cromatina participan en la regulación de la formación de RL.

El análisis de la expresión de *SKP2B* en los fondos mutante *fas1* y *fas2* muestra una alteración el patrón de expresión de *SKP2B* ya que hay una pérdida de la expresión en las células de primordios en todos los estadios de desarrollo. Cuando analizamos la expresión del promotor 0.5Kb*SKP2B*:GUS que se expresa sólo en los primordios y no en el meristemo basal y el meristemo principal de la raíz, encontramos que no hay una supresión de la expresión como ocurre con el promotor completo. Esto sugiere que los elementos en el promotor que regulan la expresión de *SKP2B* en las células fundadoras en el meristemo basal están aguas arriba del promotor de 0.5Kb ya que no encontramos expresión de *SKP2B* en esta zona en las líneas que expresan el gen reportador GUS bajo el control del promotor de 0.5Kb (Fig. 49). Con estos resultados podemos proponer un modelo de regulación de la expresión de *SKP2B* mediado por CAF-1 (Fig.49), en el que podríamos dividir el promotor en dos zonas con elementos reguladores independientes, por un lado la zona comprendida desde -0.5Kb hasta -1.7Kb, que denominamos región A y que contiene los elementos reguladores de la expresión en el meristemo de la raíz (MR) y en el meristemo basal (MB) y por otro lado, la zona comprendida entre el ATG hasta -0.5Kb que denominamos región B y que contiene los elementos reguladores responsables de la expresión las células fundadoras (CF) y en los primordios (PRL). Hemos observado que la expresión del promotor completo de *SKP2B* en los mutantes *fas1* y *fas2* se anula en todos los estadios de desarrollo del primordio y se mantiene en las células que bordean al primordio y en el meristemo radicular. En el caso de la expresión del promotor de 0.5Kb en los mutantes *fas1* y *fas2* encontramos que no hay diferencias de expresión con el control. Estos datos nos llevan a pensar que

elementos reguladores en la región A del promotor que estuvieran controlando la expresión de *SKP2B* mediada por *FAS1/FAS2* con un efecto inhibitorio aguas abajo del promotor en la región B (Fig. 49). Así, en plantas transgénicas con la construcción 0.5Kb*SKP2B*:GUS el fragmento de 0.5Kb por sí solo no estaría sometido al control de la expresión mediada por *FAS1/FAS2* en la región A. Esto podría explicarse ya que la expresión de *FAS1* en la raíz se da en el meristemo principal y en el meristemo basal pero no en el resto de la raíz (Kaya *et al.*, 2001).

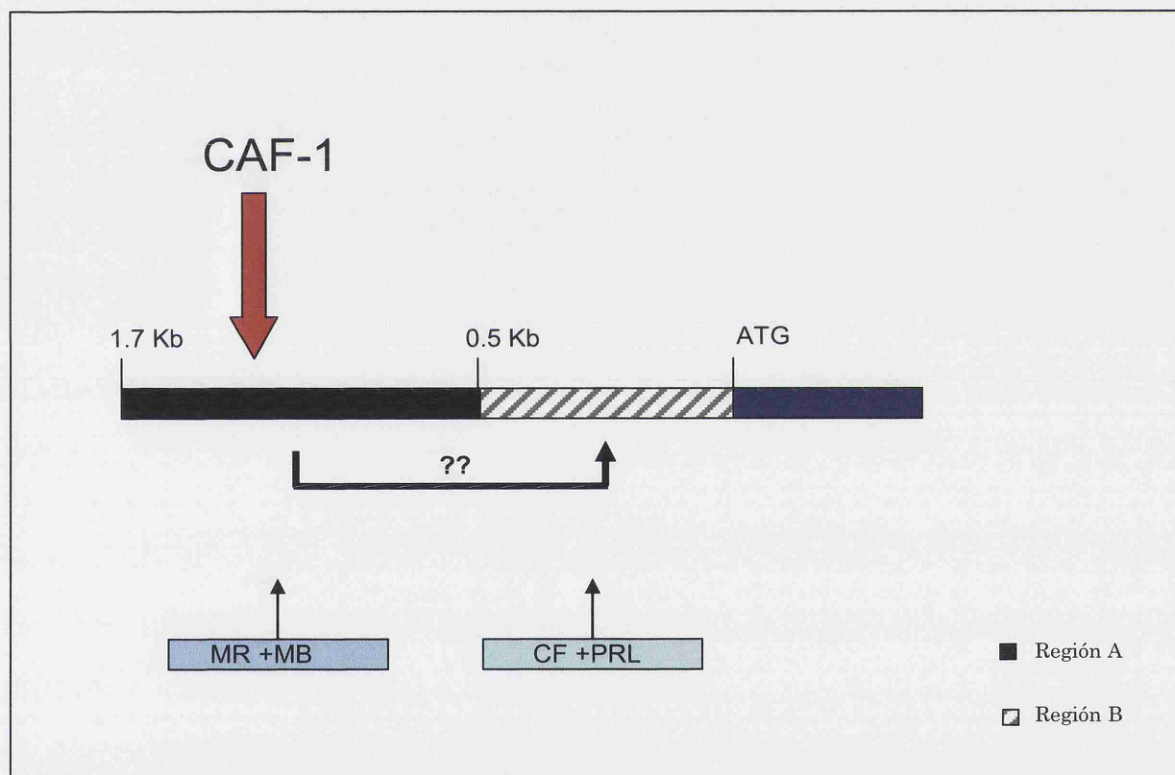


Figura 49. Modelo de regulación de la expresión de *SKP2B* mediado por CAF-1.

Es posible que la pérdida de función de los componentes del complejo CAF-1 afecte a la especificación de las células fundadoras en el meristemo basal. Sin embargo, nuestros datos indican que la pérdida de función del complejo CAF-1 parece afectar más a la emergencia del primordio que a la especificación de las células fundadoras. Estos resultados concuerdan con el efecto de la mutación en *SKP2B* que promueve división en las células fundadoras pero no emergencia de las RL.

En el caso de la histona chaperona de H3.3, HIRA1, su función sigue siendo desconocida ya que mutaciones en este gen producen fenotipos letales embrionarios (Phelps-Durr *et al.*, 2005). Se necesitarán estudios futuros de la función de esta chaperona de histona para comprender el papel de la deposición de la H3.3 en el desarrollo de raíz. En el laboratorio estamos analizando un mutante de T-ADN no letal y que no presenta apenas cambios en la expresión del gen HIRA. En el futuro podremos analizar si este mutante tiene defectos en la expresión de SKP2B en la raíz.

Trabajos recientes han mostrado que la remodelación de la cromatina es un mecanismo de regulación importante durante la formación de RL (Fukaki *et al.*, 2006; Kornet and Scheres, 2009; Aichinger *et al.*, 2009; Aichinger *et al.*, 2011). Hemos comprobado que el promotor de *SKP2B* también acumula marcas de acetilación en H3-K9/K14 para las que se ha descrito que están ligadas a activación génica. Además, hemos visto una correlación del enriquecimiento de estas marcas en el promotor con la función del gen *IAA14/SLR1* del que se ha descrito como un represor del desarrollo de RL. La búsqueda de mutantes que suprimieran el fenotipo del mutante *slr1* ha permitido la identificación de *PICKLE* (PKL) cuyo alelo mutante restaura el fenotipo del mutante *slr1* (Fukaki *et al.*, 2006). PKL es un factor remodelador de cromatina dependiente de ATP de la familia CHD3/CHD4. Cuando miembros de esta familia interaccionan con el complejo NuRD unen proteínas remodeladoras de la cromatina dependiente de ATP y deacetilasas para reprimir la transcripción génica (Bouazoune y Brehm, 2006). Sin embargo, las proteínas CHD3/CHD4 pueden asociarse con histonas acetiltransferasas para inducir la transcripción génica (Scimone *et al.*, 2010). A la luz de estos resultados podríamos especular que la deposición de H3.3 y la acetilación en la lisinas K9/K14 activan la expresión de *SKP2B* en las células fundadoras y regulan la formación de RL y que además, la acetilación de la H3 es dependiente de la vía *IAA14/SLR1*-PKL. Serán necesarios estudios futuros para elucidar el papel de *IAA14/SLR* en la acetilación de la H3 y el desarrollo de RL.

***SKP2B* como herramienta para la identificación de genes implicados en la formación de RL**

Para la identificación de genes que participan en la especificación y en la formación de las RL hemos realizado un análisis transcriptómico de genes que se expresan en los PIRL utilizando plantas transgénicas con la construcción *SKP2B*:GFP. Hemos identificado casi 200 genes (Anexo, Tabla 3) y hemos comprobado que sólo una pequeña parte solapan con genes inducidos por el tratamiento con auxina o genes representados por el sistema “LRIS” (Lateral Root Induction System) descrito por Himanen *et al.*, 2002. Esto podría explicarse porque en el sistema LRIS el tratamiento con auxina puede inducir genes que no estarían directamente relacionados con la formación de PRL y que además hay una inducción de genes en otras capas celulares de la raíz además del periciclo. Sin embargo, si reducimos la astringencia, (genes representados con un incremento de 1.3) (Datos no mostrados) hemos encontrado mayor solapamiento con los datos descritos en trabajos anteriores, así como un mayor número de genes implicados en división celular.

La señalización mediada por auxina juega un papel fundamental durante el desarrollo de RL ya que está implicada en la especificación de las células fundadoras en el meristemo basal (Dubrovsky *et al.*, 2008; Moreno-Risueño *et al.*, 2010; De Rybel *et al.*, 2010) y conduce la primera división celular asimétrica de las células del periciclo para el desarrollo del primordio (Benkova *et al.*, 2003). Es también destacable el papel de la auxina en la reprogramación de las células del córtex y epidermis que rodean al primordio para facilitar la emergencia. En este sentido se ha descrito que el módulo *IAA3/LAX3* regula la expresión de enzimas remodeladoras de pared celular y que se han implicado en separación celular (Swarup *et al.*, 2008), y que además está implicado en el número de RL que emergen. Hemos identificado un número de enzimas que participan en procesos de remodelación de pared celular (Irshad *et al.*, 2008) y que

están directamente relacionadas con el desarrollo del primordio y la emergencia (Bennett *et al.*, sin publicar). Estudios futuros nos permitirán analizar el papel de estos genes durante la formación de RL.

Entre los genes asociados a los PIRL hemos analizado funcionalmente el papel de tres factores de transcripción (TF) en la formación de RL. Hemos analizado a nivel histológico el desarrollo de PRL en los mutantes para estos factores de transcripción y hemos encontrado que participan en el desarrollo de RL. Además, hemos demostrado que uno de estos factores de transcripción, *RAP2.3*, se une al promotor de *SKP2B* sugiriendo una función directa de *RAP2.3* en la regulación de *SKP2B*. Hemos encontrado que la expresión de *SKP2B* en el fondo mutante *rap2.3* es menor y que este mutante desarrolla un menor número de primordios (Fig. 32). Este factor de transcripción pertenece a la familia AP2/ERF subgrupo B-2 que se unen a la caja GCC (Ohme-Takagi *et al.*, 1995; Büttner and Singh, 1997) y que se han implicado en respuestas tanto abióticas como bióticas de plantas (Nakano *et al.*, 2006). En el caso del promotor de *SKP2B* no hemos encontrado ningún motivo consenso GCC, sin embargo gracias a los datos generados en el proyecto “TRANSPLANTA” se ha identificado una lista de motivos de unión de RAP2.3 con distintas probabilidades (Solano, sin publicar). La matriz generada se utilizó para hacer una búsqueda de motivos en el promotor de *SKP2B* usando el programa “cistome” (<http://esc4037-shemp.csb.utoronto.ca/welcome.htm>) y hemos encontrado 2 posibles motivos uno de ellos cerca del ATG y el otro en posición -490. Estos resultados apuntan a que RAP2.3 regula la transcripción de *SKP2B* a través de la unión a un nuevo motivo diferente a la caja consenso GCC.

El factor de transcripción RAP2.3 también denominado ERF72 interacciona *in vitro* con OBF4 un factor de transcripción de tipo bZIP (Büttner and Singh, 1997). En este trabajo mostraron que *RAP2.3* se expresa a niveles altos en callos sugiriendo un posible papel en el control de la proliferación celular. Hemos analizado la expresión de *OBF4* en la raíz

utilizando el “Arabidopsis atlas” y hemos encontrado que este gen se expresa en el periciclo y la endodermis del meristemo basal de la raíz (Datos no mostrados). Sin embargo, la relevancia funcional de la interacción de RAP2.3/ERF72 y OBF4 es desconocida hasta ahora y se necesitarán investigaciones futuras para desvelar su función.

También hemos encontrado que la mutación en el gen *TMO7* produce un incremento en la expresión de *SKP2B* en el periciclo. *TMO7* codifica para un factor de transcripción de tipo bHLH y actúa como una señal intercelular móvil que promueve la iniciación de la raíz en el embrión en un proceso mediado por la ruta dependiente de MONOPTEROS (Schlereth *et al.*, 2010). Nuestros datos indican que la proteína *TMO7* podría actuar como un represor de la expresión de *SKP2B*, ya que hemos encontrado niveles de expresión de *SKP2B* más elevados en el fondo mutante *tmo7*. Sin embargo, con nuestros resultados, no podemos determinar si *TMO7* produce una represión directa o indirecta de la expresión de *SKP2B*.

Otro de los factores de transcripción, *FEZ*, para los que hemos analizado su posible implicación en la especificación y el desarrollo del primordio se ha descrito como un miembro de la familia NAC. Algunos de estos factores de transcripción, se han implicado en la especificación de algunos órganos en la parte aérea controlando la orientación de la división celular (Aida y Tasaka, 2006). En el caso de *FEZ* se ha descrito su implicación en el control de las divisiones periclinales en el meristemo de la raíz (Willemsen *et al.*, 2008) y más recientemente en el marcaje de las células fundadoras del periciclo (Moreno-Risueño *et al.*, 2010). En este trabajo, describieron que el mutante *fez-3* desarrolla menos RL emergidas que el silvestre. En nuestro trabajo, hemos encontrado que en el mutante *fez-3* hay una aceleración en la emergencia de las RL. Sin embargo, la densidad de RL no presenta diferencias significativas con respecto al control, que podría deberse a una menor tasa de producción de PRL. La diferencia de los resultados de Moreno-Risueño y col., (2010) con nuestros

resultados puede explicarse por el protocolo que utilizaron en su trabajo, ya que midieron el crecimiento de la raíz y el desarrollo del primordio utilizando plantas de 7 días a las que cortaban el meristemo principal para promover la emergencia de los primordios ya formados, mientras que nosotros hemos cuantificado en número de PRL y RL emergidas durante el desarrollo normal de la raíz.

Mutantes *sbrel*

La identificación del patrón de expresión de *SKP2B* en la raíz y su utilización como marcador del desarrollo de PRL nos ha permitido utilizarlo como herramienta para la identificación de genes implicados en el desarrollo radicular.

SBREL52

Hemos encontrado que mutante *sbrel52* complementa con el mutante descrito por Nodzon y col., (2004) para el gen *XBAT32*. Además, tanto el mutante *sbrel52* como el mutante *xbat32* comparten tanto el fenotipo de alteración en la formación de PRL como el fenotipo de la parte aérea, aunque el mutante *sbrel52* presenta un fenotipo más severo. Sin embargo, cuando hemos secuenciado en fondo *sbrel52* la región promotora de 2Kb junto con la región genómica del gen *XBAT32* no hemos encontrado ninguna mutación puntual. Además comprobamos por RT-PCR que la expresión de *XBAT32* es similar al silvestre en plantas *sbrel52*. Una posible explicación podría ser que como el mutante *xbat32* es un mutante de T-ADN, que el T-ADN haya dejado una huella en otro gen ligado genéticamente a *XBAT32* y que el fenotipo no se deba al T-ADN insertado en el gen *XBAT32*.

Se ha descrito que la enzima *XBAT32* tiene como dianas a las enzimas *ACS4* y *ACS7* que están implicadas en la biosíntesis de etileno (Prasad *et al.*, 2010). En nuestro trabajo hemos identificado por la técnica de

doble híbrido de levaduras que las proteínas LSU3, SBR1 y ERS1 interaccionan con XBAT32. Sin embargo, por ensayos de ubiquitinación *in vitro* sólo hemos podido demostrar que XBAT32 es capaz de ubiquitinar las proteínas LSU3 y SBR1 mientras que para el receptor de etileno ERS1 no hemos podido detectar ubiquitinación *in vitro*. En el caso del receptor de etileno ERS1, ya que se ha demostrado la implicación de XBAT32 en el control de enzimas de biosíntesis de etileno, no podríamos descartar totalmente que XBAT32 este participando en la regulación del receptor de etileno y el hecho de que no observemos ubiquitinación *in vitro* puede deberse a que ERS1 necesite una modificación posttraduccional en la proteína ERS1 que facilite el reconocimiento por medio de XBAT32. Otra posible explicación sería que para poder expresar *ERS1* en bacteria eliminamos el dominio transmembrana, y esto puede afectar a la estructura necesaria para facilitar la ubiquitinación.

La función del gen *SBR1* es desconocida. Este gen codifica para una proteína con un dominio CUE y se ha descrito en humanos que este dominio pertenece a proteínas con actividad conjugadora de ubiquitina (Kang *et al.*, 2003; Shih *et al.*, 2003). En *Arabidopsis* se ha caracterizado la función de tres genes que codifican para proteínas con el dominio CUE; El gen *IPD1* que promueve la entrada en endociclo para facilitar la elongación celular del hipocotilo y su función está controlada por luz roja lejana y luz azul (Tsumoto *et al.*, 2006) y los genes *RIN2* y *RIN3* que tienen además del dominio CUE el dominio RING con actividad ubiquitina ligasa y se han implicado en resistencia a *Pseudomonas syringae* (Kawasaki *et al.*, 2005). Queda por resolver el papel del gen *SBR1* en *Arabidopsis* ya que hemos comprobado que ni es capaz de unir ubiquitina ni participa en la ruta de la ubiquitina. Además la caracterización del mutante de T-ADN disponible no nos reveló ningún fenotipo bajo nuestras condiciones de crecimiento (Datos no mostrados).

En *Arabidopsis*, se han descrito como homólogos al gen *UP9C* de *Nicotiana tabacum* 4 genes denominados *LSU1* a *LSU4*. El gen *UP9C* se induce en condiciones bajas de azufre en el medio, además por la estructura de la proteína parece tener un papel importante en la interacción con otras proteínas (Lewandowska *et al.*, 2010). No obstante la función molecular de *UP9C* se desconoce. Mediante una búsqueda por doble híbrido de levaduras de proteínas que interaccionaran con *UP9C* se encontró que interaccionaba con una enzima ACC implicada en la biosíntesis de etileno (Lewandowska *et al.*, 2010). Si esta interacción tuviera lugar en *Arabidopsis*, es decir, que ACC interaccionara con proteínas LSU podríamos pensar en una regulación de enzimas ACC sintetas mediada por XBAT32 en condiciones bajas de azufre en el medio. Nuestros resultados de ubiquitinación *in vitro* (Fig. 41) muestran un mayor nivel ubiquitinación de LSU3 que de ACS4 podríamos pensar en una mayor afinidad de XBAT32 por LSU3 que por ACS4 lo que supondría que en condiciones bajas de azufre si LSU3 interaccionara con ACS4, ACS4 podría desaparecer más rápidamente. No obstante, se necesitan estudios futuros del papel de los genes LSU, su interacción en *Arabidopsis* con enzimas ACC y su implicación en condiciones de estrés en plantas.

SBREL50

La luz puede tener efectos opuestos en diferentes tejidos de la planta, la exposición a la luz inhibe la elongación del hipocotilo mientras que promueve la expansión de los cotiledones y el desarrollo de la raíz (Revisión Bou-Torrent *et al.*, 2008). El hecho de que distintos órganos o tejidos dentro de la planta regulen de forma específica procesos relacionados con la luz se ha apoyado con análisis transcriptómicos de tejidos específicos. Por ejemplo, se han identificado distintos subgrupos de genes regulados por la luz comparando expresión en cotiledones frente a raíces (Jiao *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2005) o parte aérea frente a raíz en arroz (Jiao *et al.*, 2005). En raíz, se expresan fitocromos que absorben tanto la luz roja como la luz roja lejana

(Tóth *et al.*, 2001; Salisbury *et al.*, 2007), así como los fotorreceptores de luz azul (Tóth *et al.*, 2001; Galen *et al.*, 2007). La radiación UV-B también es absorbida por la raíz y ésta absorción tiene efecto tanto en el desarrollo de la raíz como en el desarrollo de la planta (Tong *et al.*, 2008; Leasure *et al.*, 2009). El crecimiento de la raíz dependiente de la luz y la localización de los fotorreceptores en la misma implica, que la percepción de la luz en la raíz es importante para la adaptación dependiente de la luz en plantas (Costigan *et al.*, 2011). La luz puede penetrar algunos milímetros en las capas superiores del suelo y la profundidad a la que penetra depende de la composición del suelo (Tester y Morris, 1987; Mandoli *et al.*, 1990). Estos hallazgos sugieren que las raíces pueden percibir la luz directamente en ambientes naturales y que el desarrollo de la raíz está controlado por la luz en determinadas condiciones fisiológicas. De hecho, probablemente la luz sirva de señal para que la raíz detecte la profundidad a la que se encuentra en el suelo (Revisión de Shinomura 1997).

A parte de estudios sobre el papel de los fitocromos en el desarrollo de la raíz en respuesta a la luz los genes implicados en este mecanismo de regulación se desconocen. El mutante *sbrel50* tiene una parada del crecimiento de la raíz cuando se crece en luz blanca, sin embargo, cuando se crece en oscuridad o en distintas condiciones de luz hemos observado una recuperación del crecimiento de la raíz, sin embargo, aún desconocemos si la luz regula el crecimiento directamente en la raíz o si regula alguna ruta/gen/producto en la parte aérea, que posteriormente se mueva a la raíz para realizar su función. Dentro del intervalo de mapeo que hemos acotado (Anexo Tabla 4) no hemos encontrado ningún gen relacionado específicamente con respuesta a luz. Será necesaria la secuenciación del genoma de *sbrel50* para determinar el gen responsable del fenotipo del mutante. También, sería interesante el análisis transcriptómico de plantas *sbrel50* crecidas en distintas condiciones de luz para determinar los genes y las posibles rutas implicadas en la regulación del crecimiento radicular en respuesta a la luz en este mutante.



CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. *SKP2B* es una proteína nuclear y su expresión se regula a nivel de ciclo celular y en respuesta a las auxinas.
2. *SKP2B* es un regulador negativo del ciclo celular.
3. La proteína *SKP2B* no une auxina, en parte por el residuo de serina en posición 128.
4. *SKP2B* se expresa en las células fundadoras y en todos los estadios de formación de los primordios laterales y en el meristemo basal en las células fundadoras. Por ello, *SKP2B*:GUS es un buen marcador del proceso de formación de RL.
5. Hemos identificado en el promotor de *SKP2B* un motivo de expresión específico de raíz.
6. Mutaciones en *SKP2B* favorecen la división de las células fundadoras, mientras que la doble mutación *skp2b/rkp1* promueve la emergencia de las raíces laterales.
7. El promotor 0.5Kb*SKP2B* es una buena herramienta biotecnológica para modificar la arquitectura radicular.
8. El promotor de *SKP2B* está enriquecido en la variante histónica H3.3 frente a la H3.1, y este enriquecimiento está regulado por auxina. Asimismo, el promotor de *SKP2B* está regulado por la acetilación en la histona H3 y estos niveles de acetilación son dependientes de la respuesta a auxina.
9. La expresión de *SKP2B* está regulada por el complejo CAF-1. Nuestros resultados apuntan que existen dos dominios de regulación independientes dentro de la región promotora.
10. Hemos identificado nuevos genes implicados en la formación de raíces laterales. De entre estos genes, hemos verificado que tres factores de transcripción *FEZ*, *TMO7* y *RAP2.3* participan en la formación de primordios de RL.
11. El factor de transcripción *RAP2.3* se une al promotor de *SKP2B* a través de una caja diferente a la caja consenso para la familia AP2-ERF. El mutante *rap2.3* tiene afectado el desarrollo de RL y una alteración en la expresión de *SKP2B*.

12. El mutante *sbrel52* es *alélico* al mutante *xbat32* aunque no hemos encontrado ninguna mutación puntual en el gen *XBAT32*. El mutante *sbrel52* tiene alterado el desarrollo del primordio presentando una acumulación de primordios en estadio IV.
13. Las proteínas LSU3 y SBR1 son dianas de ubiquitinación de la enzima XBAT32.
14. El mutante *sbrel50* desarrolla una raíz más corta parándose el crecimiento al tercer día. Este fenotipo es dependiente de la calidad de la luz.

ANEXO

8. ANEXO.

Tabla genes expresados en PIRL.

ATG			
At1g30870	+15.35	0.00419734	Cationic peroxidase, putative
At1g05240	+10.40	0.00859134	Peroxidase, putative
At1g05250			
At5g17820	+9.04	0.00401626	Peroxidase 57 (PER57) (P57) (PRXR10)
At5g46890	+8.10	0.00018404	Protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein
At5g46900			
At3g61430	+7.86	0.00026360	PIP1A_ATPIP1_PIP1_PIP1A (PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 1A)
At1g52690	+7.58	0.00016585	Late embryogenesis abundant protein, putative / LEA protein, putative
At3g53420	+6.99	0.00317525	PIP2A_PIP2_PIP2A (PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 2A)
At3g62680	+6.59	0.01053198	PRP3_PRP3 (PROLINE-RICH PROTEIN 3); structural constituent of cell wall
At2g37170	+5.77	0.00061518	PIP2B_PIP2;2_PIP2B (plasma membrane intrinsic protein 2;2); water channel
At2g37180			
At4g12510	+5.61	0.00094965	Protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein
At4g12520			
At4g12550	+5.51	0.00057054	AIR1_AIR1 (Auxin-Induced in Root cultures 1); lipid binding
At5g35190	+5.42	0.01803858	Proline-rich extensin-like family protein
At4g26010	+5.34	0.03455682	Peroxidase, putative
At5g04960	+5.23	0.01997053	Pectinesterase family protein
At2g36830	+5.20	0.00134102	GAMMA-TIP_TIP1;1_GAMMA-TIP (Tonoplast intrinsic protein (TIP) gamma)
At2g47540	+5.16	0.01443493	Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein
At3g01190	+5.11	0.03160542	Peroxidase 27 (PER27) (P27) (PRXR7)
At5g67400	+5.05	0.03433832	Peroxidase 73 (PER73) (P73) (PRXR11)
At4g02270	+4.94	0.00937158	Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein
At1g22530	+4.89	0.00685853	PATL2_PATL2; transporter
At1g55330	+4.87	0.00253852	AGP21_AGP21 (ARABINOGALACTAN PROTEIN 21)
At3g43960	+4.72	0.00688115	cysteine proteinase, putative
At3g16240	+4.63	0.00307606	DELTA-TIP_AQP1_ATTIP2;1_DELTA-TIP1_TIP2;1__
At5g22410	+4.51	0.02973787	Peroxidase, putative
At5g44020	+4.48	0.00555936	Acid phosphatase class B family protein
At1g48930	+4.45	0.01865713	ATGH9C1 (ARABIDOPSIS THALIANA GLYCOSYL HYDROLASE 9C1)
At2g30860	+4.38	0.00233514	ATGSTF9_ATGSTF7_GLUTTR_ATGSTF9
At3g26520	+4.35	0.00562162	TIP2_SITIP_TIP1;2_TIP2 (TONOPLAST INTRINSIC PROTEIN 2); water channel
At2g16850	+4.32	0.00071640	PIP2;8_PIP3B_PIP2;8/PIP3B (plasma membrane intrinsic protein 2;8); water channel
At4g35100			

ATG			
At2g21880	+4.18	0.01008216	AtRab7A_AtRABG2_AtRABG2/AtRab7A (Arabidopsis Rab GTPase homolog G2)
At4g17340	+4.12	0.01015186	DELTA-TIP2_TIP2;2_DELTA-TIP2/TIP2;2 (tonoplast intrinsic protein 2;2); water channel
At5g54160	+4.07	0.00416623	ATOMT1_OMT1_ATOMT1 (O-METHYLTRANSFERASE 1)
At5g05500	+3.90	0.02135081	Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein
At1g45130	+3.86	0.00010665	BGAL5_BGAL5 (beta-galactosidase 5); beta-galactosidase
At3g23190	+3.85	0.02546895	lesion inducing protein-related
At1g62980	+3.81	0.02583708	ATEXPA18_ATEXP18_ATHEXP ALPHA 1.25
At4g30170	+3.75	0.02370504	Peroxidase, putative
At4g00430	+3.70	0.00212899	PIP1;4_PIP1E_TMP-C_PIP1;4_PIP1E_TMP-C
At5g56540	+3.68	0.00122680	AGP14_AGP14 (ARABINO GALACTAN PROTEIN 14)
At1g58270	+3.66	0.07214848	ZW9_ZW9 meprin and TRAF homology domain-containing protein
At1g66690	+3.61	0.00214756	S-adenosyl-L-methionine:carboxyl
At1g66700			methyltransferase family protein
At1g72150	+3.59	0.00536747	PATL1_PATL1 (PATELLIN 1); transporter
At3g49960	+3.55	0.03306852	Peroxidase, putative
At2g41970	+3.54	0.01207341	Protein kinase, putative
At2g16005	+3.47	0.00024707	MD-2-related lipid recognition domain-containing protein
At1g12560	+3.41	0.01582563	ATEXPA7_ATEXP7_ATHEXP ALPHA 1.26_EXP7
At2g45960	+3.38	0.00021626	PIP1B_ATHH2_PIP1;2_TMP-A_PIP1B (plasma membrane intrinsic protein 1;2)
At3g22570	+3.35	0.02206513	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein
At1g75750	+3.35	0.02807294	GASA1_GASA1 (GAST1 PROTEIN HOMOLOG 1)
At5g14750	+3.33	0.00019857	ATMYB66_WER_ATMYB66/WER/WER1 (WEREWOLF 1); DNA binding
At5g40730	+3.32	0.00433414	AGP24_AGP24 (ARABINO GALACTAN PROTEIN 24)
At1g12090	+3.31	0.01026097	ELP_ELP (EXTENSIN-LIKE PROTEIN); lipid binding
At3g10780	+3.30	0.00024609	emp24/gp25L/p24 family protein
At1g03870	+3.16	0.01155325	FLA9_FLA9
At2g34910	+3.15	0.02851653	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G30850.1)
At5g59090	+3.09	0.00192951	ATSBT4.12_ATSBT4.12; subtilase
At5g47450	+3.07	0.02705271	DELTA-TIP3_TIP2;3_AtTIP2;3
At5g04120	+3.06	0.02099572	Phosphoglycerate/bisphosphoglycerate mutase family protein
At1g26870	+3.01	0.00566330	ANAC009_ANAC009 (Arabidopsis NAC domain containing protein 9)
At1g75780	+2.98	0.03624159	TUB1_TUB1 (tubulin beta-1 chain); structural molecule
At4g09990	+2.95	0.02956283	Similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G33800.1)

ATG			
At5g49270	+2.93	0.02944553	COBL9_MRH4_SHV2__COBL9/MRH4/SHV2 (COBRA-LIKE 9, SHAVEN 2)
At1g05260	+2.89	0.05971375	RCI3__RCI3 (RARE COLD INDUCIBLE GENE 3); peroxidase
At1g04040	+2.88	0.09931494	Acid phosphatase class B family protein
At4g23400	+2.84	0.00360598	PIP1;5_PIP1D__PIP1;5/PIP1D (plasma membrane intrinsic protein 1;5); water channel
At5g10430	+2.83	0.00350669	AGP4__AGP4 (ARABINO GALACTAN-PROTEIN 4)
At4g40090	+2.82	0.03591967	AGP3__AGP3 (ARABINO GALACTAN-PROTEIN 3)
At4g14690	+2.80	0.01702664	ELIP2__ELIP2 (EARLY LIGHT-INDUCIBLE PROTEIN 2); chlorophyll binding
At5g57530	+2.80	0.05839282	Xyloglucan:xyloglucosyl transferase, putative
At4g00680	+2.76	0.03067908	Actin-depolymerizing factor, putative
At3g22600	+2.75	0.08049153	Protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein
At3g10710	+2.75	0.05575844	Pectinesterase family protein
At1g52760	+2.75	0.00163420	Esterase/lipase/thioesterase family protein
At3g04010	+2.74	0.02285594	Glycosyl hydrolase family 17 protein
At1g05650	+2.74	0.05773421	Polygalacturonase, putative / pectinase, putative
At4g33930	+2.73	0.00080960	Glycine-rich protein
At4g34300			
At5g55050	+2.72	0.03359050	GDSL-motif lipase/hydrolase family protein
At1g63450	+2.72	0.01040188	catalytic
At2g29750	+2.72	0.04596126	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein
At2g05790	+2.69	0.00061000	Glycosyl hydrolase family 17 protein
At4g01070	+2.66	0.01696933	GT72B1__GT72B1; UDP-glucosyltransferase/UDP-glycosyltransferase
At4g11290	+2.65	0.03952390	peroxidase, putative
At2g20625	+2.64	0.00730072	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT2G20620.1)
At1g60190	+2.64	0.00040372	Armadillo/beta-catenin repeat family protein / U-box domain-containing protein
At3g61890	+2.63	0.00013325	ATHB-12__ATHB12__ATHB-12 (ARABIDOPSIS THALIANA HOMEODOMAIN PROTEIN 12)
At2g37040	+2.61	0.01008604	PAL1__PAL1 (PHE AMMONIA LYASE 1); phenylalanine ammonia-lyase
At4g05100	+2.58	0.00614129	AtMYB74__AtMYB74 (myb domain protein 74); DNA binding / transcription factor
At1g54970	+2.58	0.06631725	ATPRP1__ATPRP1 (PROLINE-RICH PROTEIN 1); structural constituent of cell wall
At1g13420	+2.57	0.00834943	Sulfotransferase family protein
At5g64100	+2.56	0.01535972	Peroxidase, putative
At4g21960	+2.56	0.00509820	PRXR1__PRXR1 (peroxidase 42); peroxidase
At1g62380	+2.54	0.00000317	ACO2__ACO2 (ACC OXIDASE 2)
At1g70940	+2.54	0.00059588	PIN3__PIN3 (PIN-FORMED 3); auxin:hydrogen symporter/ transporter
At2g14960	+2.54	0.00484180	GH3.1__GH3.1
At1g01780	+2.53	0.00437653	LIM domain-containing protein

ATG			
At3g51240	+2.52	0.00088389	F3H_F3'H_TT6_F3H (TRANSPARENT TESTA 6); naringenin 3-dioxygenase
At4g30670	+2.52	0.00332237	PROKAR_LIPOPROTEIN (PS51257)
At1g32900	+2.52	0.00020415	Starch synthase, putative
At1g62800	+2.51	0.00641084	ASP4__ASP4 (ASPARTATE AMINOTRANSFERASE 4)
At5g65390	+2.50	0.00261517	AGP7__AGP7 (Arabinogalactan protein 7)
At2g41660	+2.48	0.00728859	MIZ1__MIZ1 (MIZU-KUSSEI 1)
At4g30830	+2.48	0.00791588	Similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT2G24140.1)
At3g07880	+2.47	0.01426971	Rho GDP-dissociation inhibitor family protein
At1g68560	+2.47	0.00019343	ATXYL1_XYL1__ATXYL1/XYL1 (ALPHA-XYLOSIDASE 1); alpha-N-arabinofuranosidase
At2g06850	+2.47	0.00032767	EXGT-A1_EXT__EXGT-A1 (ENDOXYLOGLUCAN TRANSFERASE)
At5g02070	+2.45	0.00035567	Protein kinase-related
At3g14560	+2.42	0.00130920	Unknown protein
At1g60010	+2.41	0.00810963	Similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G10530.1)
At4g37470	+2.40	0.00569349	Hydrolase, alpha/beta fold family protein
At3g13520	+2.39	0.00051077	AGP12__AGP12 (ARABINOGALACTAN PROTEIN 12)
At5g49760	+2.38	0.05189983	Leucine-rich repeat family protein / protein kinase family protein
At1g27740	+2.38	0.03118138	Basic helix-loop-helix (bHLH) family protein
At1g53830	+2.38	0.00648870	ATPME2__ATPME2 (Arabidopsis thaliana pectin methylesterase 2)
At4g34970	+2.37	0.00018360	Actin binding
At4g33790	+2.37	0.03058323	Acyl CoA reductase, putative
At3g14310	+2.37	0.01064421	ATPME3__ATPME3 (Arabidopsis thaliana pectin methylesterase 3)
At4g23690	+2.36	0.02317784	Disease resistance-responsive family protein / dirigent family protein
At3g24240	+2.35	0.00000262	Leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative
At3g26744	+2.35	0.00016498	ICE1__ICE1 (INDUCER OF CBF EXPRESSION 1); DNA binding
At2g23340	+2.33	0.00364152	AP2 domain-containing transcription factor, putative
At4g14130	+2.33	0.00060388	XTR7__XTR7 (XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLYCOSYLASE 7)
At4g34580	+2.33	0.08515770	Transporter
At1g33800	+2.32	0.00160476	Similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT4G09990.1)
At2g14620	+2.32	0.00009651	Xyloglucan:xyloglucosyl transferase, putative
At4g36010	+2.31	0.03221195	Pathogenesis-related thaumatin family protein
At5g57420	+2.29	0.00739065	IAA33__IAA33 (indoleacetic acid-induced protein 33); transcription factor
At2g23050	+2.29	0.00129236	Phototropic-responsive NPH3 family protein
At4g35060	+2.28	0.00077965	Heavy-metal-associated domain-containing protein / copper chaperone (CCH)-related
At1g33290	+2.28	0.00556733	Sporulation protein-related

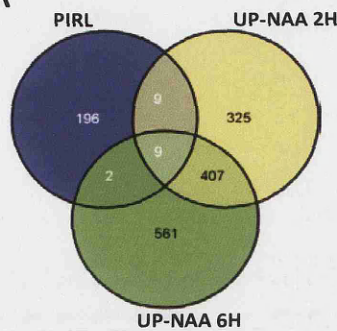
ATG			
At3g23810	+2.28	0.02652011	SAHH2__SAHH2 (S-ADENOSYL-L-HOMOCYSTEINE (SAH) HYDROLASE 2)
At1g01620	+2.28	0.00034884	PIP1;3_PIP1C_PIP1;3_TMP-B_PIP1C (PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 1;3)
At5g17760	+2.27	0.00142415	AAA-type ATPase family protein
At4g26890	+2.27	0.00097408	MAPKKK16__MAPKKK16 (Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 16); kinase
At3g18200	+2.27	0.01517430	Nodulin MtN21 family protein
At5g53250	+2.26	0.00350152	AGP22__AGP22/ATAGP22 (ARABINOGLACTAN PROTEINS 22)
At4g25820	+2.26	0.06827449	XTR9__XTR9 (XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLYCOSYLASE 9)
At3g23510	+2.26	0.01076683	cyclopropane fatty acid synthase, putative /
At3g23530			CPA-FA synthase, putative
At2g24490	+2.26	0.00643544	ATRAP2_ROR1_RPA2__ATRAP2/ROR1/RPA2 (REPLICON PROTEIN A)
At4g15290	+2.25	0.00660413	ATCSLB05_ATCSLB5_CSLB05__ATCSLB05 (Cellulose synthase-like B5); transferase
At3g28540	+2.25	0.00400506	AAA-type ATPase family protein
At1g77450	+2.25	0.00252156	ANAC032__ANAC032 (Arabidopsis NAC domain containing protein 32)
At5g01320	+2.23	0.09503261	Pyruvate decarboxylase, putative
At5g01330			
At5g42250	+2.22	0.01402083	Alcohol dehydrogenase, putative
At4g37520	+2.22	0.00625309	Peroxidase 50 (PER50) (P50) (PRXR2)
At4g37530			
At1g76090	+2.22	0.05896744	SMT3__SMT3 (S-adenosyl-methionine-sterol-C-methyltransferase 3)
At2g21630	+2.22	0.00085318	Transport protein, putative
At5g56790	+2.21	0.00210717	Protein kinase family protein
At3g02480	+2.21	0.00028593	ABA-responsive protein-related
At5g57560	+2.20	0.00080155	TCH4_XTH22__TCH4 (TOUCH 4); hydrolase, acting on glycosyl bonds
At1g74500	+2.20	0.00114706	bHLH family protein
At1g01790	+2.20	0.00211054	KEA1__KEA1 (K EFFLUX ANTIporter 1); potassium:hydrogen antiporter
At4g26320	+2.19	0.00820234	AGP13__AGP13 (ARABINOGLACTAN PROTEIN 13)
At3g16770	+2.19	0.00009903	ATEBP_RAP2.3__ATEBP/ERF72/RAP2.3 (RELATED TO AP2 3); DNA binding
At1g23760	+2.19	0.00160884	JP630__JP630; polygalacturonase
At3g21240	+2.18	0.01301488	4CL2__4CL2 (4-coumarate:CoA ligase 2); 4-coumarate-CoA ligase
At1g20440	+2.18	0.00169009	COR47_RD17__COR47 (cold regulated 47)
At1g49660	+2.18	0.00055540	ATCXE5__ATCXE5 (ARABIDOPSIS THALIANA CARBOXYESTERASE 5)
At1g23460	+2.18	0.00531300	Polygalacturonase
At1g23470			
At1g23480	+2.18	0.02247354	ATCSLA03_ATCSLA3_CSLA03__ATCSLA03 (Cellulose synthase-like A3)
At5g16900	+2.17	0.00033813	Leucine-rich repeat protein kinase, putative
At2g25810	+2.17	0.05725129	TIP4;1__TIP4;1 (tonoplast intrinsic protein 4;1);

ATG				
				water channel
At2g45890	+2.17	0.02617636	ATROPGEF4_ROPGEF4__ATROPGEF4/ROPG	
At5g56500	+2.16	0.00442526	EF4 (KINASE PARTNER PROTEIN-LIKE)	
At1g67090	+2.16	0.19862313	ATP binding / protein binding / unfolded protein	
At5g38410			binding	
At5g38420			RBCS1A__RBCS1A; ribulose-bisphosphate	
At5g38430			carboxylase	
At4g32450	+2.15	0.00205001	Pentatricopeptide (PPR) repeat-containing	
At2g45470	+2.14	0.00563159	protein	
At1g05200	+2.14	0.01459103	FLA8_AGP8__FLA8 (Arabinogalactan protein	
At2g19970	+2.14	0.02109374	8)	
At2g30930	+2.14	0.04406149	ATGLR3.4_GLR3.4_GLUR3__ATGLR3.4	
At4g39800	+2.13	0.00243122	(Arabidopsis thaliana glutamate receptor 3.4)	
At3g01840	+2.13	0.00094996	pathogenesis-related protein, putative	
At2g32270	+2.13	0.10961091	Similar to unknown protein [Arabidopsis	
At5g44770	+2.12	0.00006843	thaliana] (TAIR:AT1G06540.1)	
At5g24660	+2.12	0.02250159	MI-1-P SYNTHASE__MI-1-P SYNTHASE (Myo-	
At4g13660	+2.12	0.00387346	inositol-1-phosphate synthase)	
At5g24140	+2.11	0.02238013	protein kinase family protein	
At3g44750	+2.10	0.00986347	ZIP3__ZIP3 (ZINC TRANSPORTER 3	
At2g21050	+2.10	0.00017425	PRECURSOR); zinc ion transmembrane	
At4g02290	+2.09	0.00333413	transporter	
At3g06035	+2.09	0.00038005	DC1 domain-containing protein	
At3g06770	+2.09	0.00408775	similar to unknown protein [Arabidopsis	
At2g23910	+2.09	0.00014741	thaliana] (TAIR:AT5G24655.1); LSU2	
At5g49360	+2.08	0.02600537	pinoresinol-lariciresinol reductase, putative	
At4g34210	+2.08	0.00123578	SQP2__SQP2 (Squalene monooxygenase 2);	
At4g34470	+2.08	0.00111100	oxidoreductase	
At1g09570	+2.08	0.00111100	HD2A_HDA3_HDT1__HD2A (HISTONE	
At2g01420	+2.08	0.00245142	DEACETYLASE 2A); nucleic acid binding	
At2g32440	+2.08	0.00389924	amino acid permease, putative LAX2	
At5g57540	+2.07	0.00590098	ATGH9B13 (ARABIDOPSIS THALIANA	
At5g51060	+2.07	0.13774675	GLYCOSYL HYDROLASE 9B13)	
			Identical to Uncharacterized GPI-anchored	
			protein At3g06035 precursor	
			Glycoside hydrolase family 28 protein /	
			polygalacturonase (pectinase) family protein	
			Cinnamoyl-CoA reductase-related	
			BXL1__BXL1 (BETA-XYLOSIDASE 1);	
			hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds	
			ASK11__ASK11 (ARABIDOPSIS SKP1-LIKE	
			11); ubiquitin-protein ligase	
			PHYA_FHY2_FRE1_HY8__PHYA	
			(PHYTOCHROME A)	
			PIN4__PIN4 (PIN-FORMED 4); auxin:hydrogen	
			symporter	
			KAO2_CYP88A4__KAO2 (ENT-KAURENOIC	
			ACID HYDROXYLASE 2); oxygen binding	
			Xyloglucan:xyloglucosyl transferase, putative /	
			xyloglucan endotransglycosylase, putative	
			RHD2_ATRBOHC_RBOHC__RHD2 (ROOT	
			HAIR DEFECTIVE 2)	

ATG			
At4g30560	+2.07	0.04037158	ATCNGC9_CNGC9__ATCNGC9 (CYCLIC NUCLEOTIDE GATED CHANNEL 9); calmodulin binding
At2g01880	+2.07	0.00010755	ATPAP7_PAP7__ATPAP7/PAP7 (purple acid phosphatase 7); acid phosphatase/ protein serine
At1g67330	+2.07	0.02776680	Similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G27930.1)
At2g38170	+2.07	0.00373088	CAX1_RCI4__CAX1 (CATION EXCHANGER 1); calcium:hydrogen antiporter
At5g54840	+2.06	0.00097267	GTP-binding family protein
At3g22840	+2.06	0.03139440	ELIP1_ELIP__ELIP1 (EARLY LIGHT-INDUCABLE PROTEIN); chlorophyll binding
At3g07070	+2.06	0.10321135	protein kinase family protein
At1g72160	+2.06	0.00157243	SEC14 cytosolic factor family protein / phosphoglyceride transfer family protein
At2g47270	+2.06	0.00040140	transcription factor/ transcription regulator PEROXIDASE REGULATOR CELL-BENFEY
At1g01750	+2.06	0.00110367	Actin-depolymerizing factor, putative
At2g30520	+2.06	0.01186565	RPT2__RPT2 (ROOT PHOTOTROPISM 2)
At1g25230	+2.05	0.00986507	purple acid phosphatase family protein
At3g28210	+2.05	0.00109417	PMZ__PMZ; zinc ion binding
At2g34070	+2.03	0.00812209	Similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G29050.1)
At2g02130	+2.03	0.00721711	LCR68_PDF2.3__LCR68/PDF2.3 (Low-molecular-weight cysteine-rich 68); protease inhibitor
At4g37060	+2.02	0.03425437	PLA IVB_PLP5__PLA IVB/PLP5 (Patatin-like protein 5); nutrient reservoir
At4g37070	+2.02	0.00891048	glycosyl hydrolase family 17 protein
At5g55180	+2.02	0.00223816	SUPER1_YUCCA5__SUPER1/YUCCA5 (SUPPRESSOR OF ER1); monooxygenase
At5g01600	+2.02	0.00052324	ATFER1__ATFER1 (FERRETIN 1); ferric iron binding
At2g43820	+2.02	0.05675783	GT__GT/UGT74F2 (UDP-GLUCOSYLTRANSFERASE 74F2)
At1g14720	+2.02	0.00053337	
At1g19900	+2.01	0.00569086	Glyoxal oxidase-related
At3g21770	+2.01	0.00025190	Peroxidase 30 (PER30) (P30) (PRXR9)
At2g43480	+2.01	0.01136313	Peroxidase, putative

Tabla 3. Genes expresados en los PIRL.

A



Elementos comunes "PIRL", "UP NAA 2H" y "UP NAA 6H":

248118_at	At5g55050	GDSL-motif lipase/hydrolase family protein
262263_at	At1g70940	PIN3__PIN3 (PIN-FORMED 3); auxin:hydrogen symporter/ transporter
266611_at	At2g14960	GH3.1__GH3.1
263737_at	At1g60010	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana]
257244_at	At3g24240	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative
265175_at	At1g23480	ATCSLA03__ATCSLA3__CSLA03__ATCSLA03 (Cellulose synthase-like A3)
252625_at	At3g44750	HD2A_HDA3_HDT1__HD2A (HISTONE DEACETYLASE 2A); nucleic acid binding
255517_at	At4g02290	ATGH9B13 (ARABIDOPSIS THALIANA GLYCOSYL HYDROLASE 9B13)
248486_at	At5g51060	RHD2__ATRBOHC__RBOHC__RHD2 (ROOT HAIR DEFECTIVE 2)

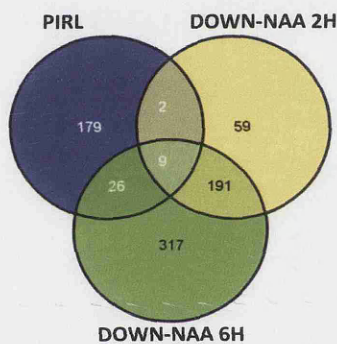
Elementos comunes en "PIRL" y "UP-NAA 2H":

245306_at	At4g14690	ELIP2 (EARLY LIGHT-INDUCIBLE PROTEIN 2); chlorophyll binding
250062_at	At5g17760	AAA-type ATPase family protein
248252_at	At5g53250	ATAGP22__AGP22 (ARABINOGALACTAN PROTEIN 22)
265695_at	At2g24490	ATRAP2__ROR1__RPA2 (REPLICON PROTEIN A2); protein binding
264025_at	At2g21050	amino acid permease, putative
266578_at	At2g23910	cinnamoyl-CoA reductase-related
258321_at	At3g22840	ELIP1 (EARLY LIGHT-INDUCIBLE PROTEIN); chlorophyll binding
260527_at	At2g47270	transcription factor/ transcription regulator
256576_at	At3g28210	PMZ; zinc ion binding

Elementos comunes en "PIRL" y "UP-NAA 6H":

265588_at	At2g19970	pathogenesis-related protein, putative
253622_at	At4g30560	CNGC9__ATCNGC9 (CYCLIC NUCLEOTIDE GATED CHANNEL 9); calmodulin binding

B



Elementos comunes en "PIRL", "DOWN NAA 2H" y "DOWN NAA 6H":

248844_s_at	At5g46890	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein
254820_s_at	At4g12510	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein
253667_at	At4g30170	peroxidase, putative
262947_at	At1g75750	GASA1 (GAST1 PROTEIN HOMOLOG 1)
248790_at	At5g47450	DELTA-TIP3__TIP2;3__ATIP2;3; ammonia transporter/ water channel
254325_at	At4g14130	XTR7 (XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLYCOSYLASE 7); hydrolase, acting on glycosyl bonds
248622_at	At5g49360	ATBXL1__BXL1 (BETA-XYLOSIDASE 1); hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds
245637_at	At1g25230	purple acid phosphatase family protein
255814_at	At1g19900	glyoxal oxidase-related

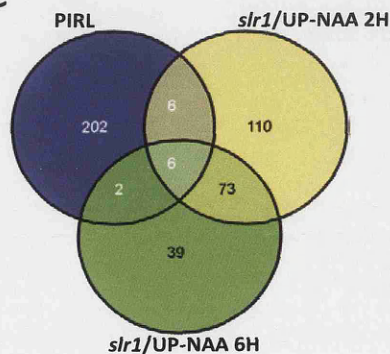
Elementos comunes en "PIRL" and "DOWN NAA 2H":

264371_at	At1g12090	ELP (EXTENSIN-LIKE PROTEIN); lipid binding
267093_at	At2g38170	ATCAX1__RC14; calcium ion transmembrane transporter/calcium:hydrogen antiporter

Elementos comunes en "PIRL" and "DOWN NAA 6H":

251324_at	At3g61430	ATPIP1_PIP1;1__PIP1A (PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 1A); water channel
262128_at	At1g52690	late embryogenesis abundant protein, putative / LEA protein, putative
263867_at	At2g36830	GAMMA-TIP1__TIP1;1__GAMMA-TIP (GAMMA TONOPLAST INTRINSIC PROTEIN); water channel
249073_at	At5g44020	acid phosphatase class B family protein
267153_at	At2g30860	ATGSTF7__ (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE PHI 9); glutathione peroxidase/ glutathione transferase
257313_at	At3g26520	GAMMA-TIP2__SITIP__TIP1;2__TIP2 (TONOPLAST INTRINSIC PROTEIN 2); water channel
245399_at	At4g17340	DELTA-TIP2__TIP2;2 (TONOPLAST INTRINSIC PROTEIN 2;2); water channel
260944_at	At1g45130	BGAL5 (beta-galactosidase 5); beta-galactosidase/ catalytic/ cation binding
247965_at	At5g56540	ATAGP14__AGP14 (ARABINOGALACTAN PROTEIN 14)
256021_at	At1g58270	ZW9
259803_at	At1g72150	PATL1 (PATELUN 1); transporter
247755_at	At5g59090	ATSBTA.12; identical protein binding / serine-type endopeptidase
254239_at	At4g23400	PIP1D__PIP1;5 (PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 1;5); water channel
251272_at	At3g61890	ATHB12__ATHB-12 (HOMEBOX 12); transcription activator
261559_at	At1g01780	LIM domain-containing protein
258091_at	At3g14560	unknown protein
254226_at	At4g23690	disease resistance-responsive family protein / dirigent family protein
259431_at	At1g01620	PIP1;3__TMP-B__PIP1C (PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 1C); water channel
259705_at	At1g77450	anac032 (Arabidopsis NAC domain containing protein 32); transcription factor
258498_at	At3g02480	ABA-responsive protein-related
265131_at	At1g23760	JP630; polygalacturonase
264474_s_at	At1g67090	RBCS1A (RIBULOSE BISPHOSPHATE CARBOXYLASE SMALL CHAIN 1A)
251395_at	At2g45470	AGP8__FLA8 (FASCICLIN-LIKE ARABINOGALACTAN PROTEIN 8)
249752_at	At5g24660	LSU2 (RESPONSE TO LOW SULFUR 2)
262842_at	At1g14720	ATXTH28__EXGT-A2__XTR2 (XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLYCOSYLASE RELATED 2)
257952_at	At3g21770	peroxidase 30 (PER30) (P30) (PRXR9)

C



Elementos comunes en "PIRL", "slr1/UP-NAA2H" y slr1/UP-NAA 6H:

245306_at	At4g14690	ELIP2__Chlorophyll A-B binding family protein
266611_at	At2g14960	GH3.1__Auxin-responsive GH3 family protein
252123_at	At3g51240	F3'H_F3H_TT6__flavanone 3-hydroxylase
257244_at	At3g24240	Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase family protein
266578_at	At2g23910	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
258321_at	At3g22840	ELIP_ELIP1__Chlorophyll A-B binding family protein

Elementos comunes en "PIRL" y "slr1/UP-NAA2H":

262263_at	At1g70940	ATPIN3__PIN3__Auxin efflux carrier family protein
256964_at	At3g13520	AGP12__ATAGP12__arabinogalactan protein 12

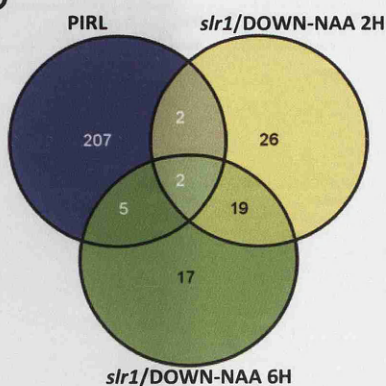
250062_at	At5g17760	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein
259705_at	At1g77450	anac032__NAC032__NAC domain containing protein 32

258498_at	At3g02480	Late embryogenesis abundant protein (LEA) family protein
262128_at	At1g52690	Late embryogenesis abundant protein (LEA) family protein

Elementos comunes en "PIRL" y "slr1/UP-NAA6H":

257173_at	At3g23810	ATSAHH2__SAHH2__S-adenosyl-L-homocysteine (SAH) hydrolase 2
256576_at	At3g28210	PMZ_SAP12__zinc finger (AN1-like) family protein

D



Elementos comunes en "PIRL", "slr1/DOWN-NAA2H" y slr1/DOWN-NAA 6H:

248844_s_at At5g46890 Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein
254820_s_at At4g12510 Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein

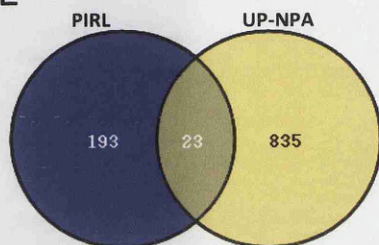
Elementos comunes en "PIRL" y "slr1/DOWN-NAA2H":

263098_at At2g16005 MD-2-related lipid recognition domain-containing protein
248622_at At5g49360 ATBXL1_BXL1__beta-xylosidase 1

Elementos comunes en "PIRL" y "slr1/DOWN-NAA6H":

249073_at At5g44020 acid phosphatase class B family protein
253667_at At4g30170 peroxidase, putative
264577_at At1g05260 RCI3__RCI3 (RARE COLD INDUCIBLE GENE 3); peroxidase
254914_at At4g11290 peroxidase, putative
245325_at At4g14130 XTR7__XTR7 (XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLYCOSYLASE 7); hydrolase, acting on glycosyl bonds
263098_at At2g16005 MD-2-related lipid recognition domain-containing protein / ML domain-containing protein
248622_at At5g49360 BXL1__BXL1 (BETA-XYLOSIDASE 1); hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds

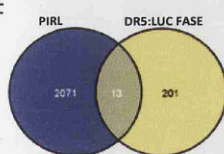
E



Elementos comunes en "PIRL" y "UP NPA":

264567_s_at At1g05240 peroxidase, putative
262128_at At1g52690 late embryogenesis abundant protein, putative / LEA protein, putative
251226_at At3g62680 ATPRP3__PRP3 (PROLINE-RICH PROTEIN 3); structural constituent of cell wall
254828_at At4g12550 AIR1; lipid binding
253998_at At4g26010 peroxidase, putative
263867_at At2g36830 GAMMA-TIP1_TIP1;1__GAMMA-TIP (GAMMA TONOPLAST INTRINSIC PROTEIN); water channel
255516_at At4g02270 pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein
245399_at At4g17340 DELTA-TIP2__TIP2;2 (TONOPLAST INTRINSIC PROTEIN 2;2); water channel
263098_at At2g16005 MD-2-related lipid recognition domain-containing protein / ML domain-containing protein
247755_at At5g59090 ATSBT4.12; identical protein binding / serine-type endopeptidase
248790_at At5g47450 DELTA-TIP3_TIP2;3__ATIP2;3; ammonia transporter/water channel
254239_at At4g23400 PIP1D__PIP1;5 (PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 1;5); water channel
256933_at At3g22600 protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein
258805_at At3g04010 glycosyl hydrolase family 17 protein
255250_at At4g05100 AtMYB74 (myb domain protein 74); DNA binding / transcription factor
245113_at At2g41660 MIZ1 (mizu-kussei 1)
258091_at At3g14560 unknown protein
254044_at At4g25820 XTR9 (XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLYCOSYLASE 9); hydrolase, acting on glycosyl bonds
258498_at At3g02480 ABA-responsive protein-related
259570_at At1g20440 RD17__COR47 (COLD-REGULATED 47)
251395_at At2g45470 AGP8__FLA8 (FASCICLIN-LIKE ARABINOGLACTAN PROTEIN 8)
266118_at At2g02130 PDF2.3_LCR68 (LOW-MOLECULAR-WEIGHT CYSTEINE-RICH 68); peptidase inhibitor
246252_s_at At4g37060 PLA IVB__PLP5 (PATATIN-LIKE PROTEIN 5); nutrient reservoir

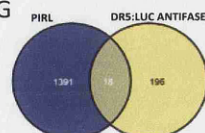
F



Elementos comunes en "PIRL" y DR5:LUC fase:

266375_at At2g14620 XTH10__xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 10
263098_at At2g16005 MD-2-related lipid recognition domain-containing protein
249773_at At5g41440 SQP2__squalene monooxygenase 2
250062_at At2g17760 P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein
253217_at At4g44970 ADP-actin depolymerizing factor 9
263683_at At1g26870 ANAC099_FIE_NAC (No Apical Meristem) domain transcriptional regulator superfamily protein
258760_at At3g10780 emp24/gp25/g24 family/GOLD family protein
256596_at At3g28540 P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein
251081_at At5g02070 Protein kinase family protein
264587_at At1g05200 ATGLR3.4_GLR3.4_GLR3__glutamate receptor 3.4
261191_at At1g62900 UDP-Glycosyltransferase superfamily protein
251277_at At3g51890 ATH12__ATH12_HB12__homeobox 12
253937_at At4g26890 MAPKKK16__mitogen-activated protein kinase kinase kinase 16

G



Elementos comunes en "PIRL" y DR5:LUC antifase:

259664_at At1g53330 AGP21__ATAGP21__arabinogalactan protein 21
259705_at At1g77450 anac052_NAC52__NAC domain containing protein 32
259276_at At3g03190 Peroxidase superfamily protein
257175_at At3g23833 AT5AHW2__SAH2__S-adenosyl-L-homocysteine (SAH) hydrolase 2
253503_at At4g17470 alpha/beta-hydrolases superfamily protein
260944_at At1g45130 BGAL3__beta-galactosidase 5
258837_at At3g07980 SCN1__immunoglobulin E-sit superfamily protein
254186_at At4g12960 PGR1__Peroxidase superfamily protein
265066_at At1g03870 FLA9__FASCICLIN-like arabinogalactan 9
264371_at At1g12090 ELP__elastin-like protein
264998_at At1g67330 Protein of unknown function (DUF579)
266213_at At2g06800 EXOT-41__EXT__xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 4
266649_at At2g25810 TPA1__Tropaeolum trinitense protein 6.1
267093_at At2g38170 ATCAK1_CAK1__carnitine exchanger 1
258321_at At3g22840 ELP1_ELP1__Chlorophyll a-b binding family protein
253667_at At3g03170 Peroxidase family protein
250407_at At2g26490 AGP4__arabinogalactan protein 4
247389_at At5g65390 AGP7__arabinogalactan protein 7

Figura 31. Diagrama Venny comparando con genes que se expresan en los PIRL. A) Genes que se expresan en los PIRL y genes que se inducen en plantas tratadas con auxina 2 y 6 horas. B) Genes que se expresan en los PIRL y genes que bajan la expresión en plantas tratadas con auxina 2 y 6 horas. C) Genes que se expresan en los PIRL y genes que se inducen en el mutante *slr1* a las 2 y 6 horas del tratamiento con auxina. D) Genes que se expresan en los PIRL y genes que se reprimen en el mutante *slr1* a las 2 y 6 horas del tratamiento con auxina. E) Genes que se expresan en los PIRL y genes que se inducen en plantas tratadas con NPA. F) Genes que se expresan en los PIRL y genes que se expresan en fase con promotor de respuesta a auxina DR5. G) Genes que se expresan en los PIRL y genes que se expresan en antifase con el promotor de respuesta a auxina DR5.

Gen	Descripción	Secuenciación
At2g39805	Yip family protein	Sí cDNA
At2g39810	HOS1	No
At2g39820	elf6	Sí cDNA
At2g39830	DAR2	Sí Genómico
At2g39840	TOPP4	Sí cDNA
At2g39850	Subtilisin like Serine	No
At2g39851	Serine type endopeptidase	No
At2g39855	Unknown	No
At2g39860	Unknown	No
At2g39865	Unknown	No
At2g39870	Unknown	No
At2g39880	MYB25	Sí Genómico
At2g39885	miRNA 393A	Sí Genómico
At2g39890	Proline transporter	No
At2g39900	LIM domain	No
At2g39910	ARM repeat family protein	Sí Genómico
At2g39920	Acid phosphatase class B family protein	No
At2g39930	Isomylase-type debranching enzyme	No
At2g39940	COI	No
At2g39950	Similar to Os07g0100500	No
At2g39960	Identical to Probable signal peptidase complex	No
At2g39970	ATFOLT1	Sí cDNA
At2g39975	Unknown	No
At2g39980	Transferase family protein	No
At2g39990	elf2	Sí Genómico
At2g40000	ATHSPROT	No
At2g40008	Unknown	No
At2g40010	60S acidic ribosomal protein	cDNA
At2g40020	Unknown	No
At2g40030	ATNRPD	No
At2g40050	DC1 domain containing protein	No
At2g40060	Protein binding	No
At2g40070	Unknown	No
At2g40080	ELF4	Sí cDNA
At2g40081	Unknown	No
At2g40085	Unknown	No
At2g40090	ATATH9 transporter	No
At2g40100	Light harvsting complex	No
At2g40110	Yipee family protein	No

Tabla 4. Genes secuenciados del intervalo de mapeo del mutante *sbrel50*.

BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad K. y Henikoff S (2002) **The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly.** Mol Cell. 2002 Jun;9(6):1191-200.
- Aichinger E, Villar CB, Di Mambro R, Sabatini S, Köhler C. **The CHD3 chromatin remodeler PICKLE and polycomb group proteins antagonistically regulate meristem activity in the Arabidopsis root** (2011) Plant Cell. Mar;23(3):1047-60. Epub 2011 Mar 25.
- Aida M, Tasaka M (2006) **Morphogenesis and patterning at the organ boundaries in the higher plant shoot apex.** Plant Mol Biol. Apr;60(6):915-28. Review.
- Ahringer J (2000) **NuRD and SIN3.** Trends Genet 16:351–356.
- Aichinger E, Villar CB, Farrona S, Reyes JC, Hennig L, Köhler C (2009) **CHD3 proteins and polycomb group proteins antagonistically determine cell identity in Arabidopsis.** PLoS Genet. Aug;5(8):e1000605. Epub 2009 Aug 14.
- Aida, M. Beis D, Heidstra R, Willemsen V, Blilou I, Galinha C, Nussaume L, Noh YS, Amasino R, Scheres B. (2004) **The PLETHORA genes mediate patterning of the Arabidopsis root stem cell niche.** Cell 119, 109–120
- Bao F, Shen J, Brady SR, Muday GK, Asami T, Yang Z. (2004) **Brassinosteroids interact with auxin to promote lateral root development in Arabidopsis.** Plant Physiol. Apr;134(4):1624-31. Epub 2004 Mar 26.
- Barlier, I, Kowalczyk M, Marchant A, Ljung K, Bhalerao R, Bennett M, Sandberg G, Bellini C. (2000) **The SUR2 gene of Arabidopsis thaliana encodes the cytochrome P450 CYP83B1, a modulator of auxin homeostasis.** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 97, 14819–14824
- Beeckman, T, Burssens S, Inzé D. (2001) **The peri-cell-cycle in Arabidopsis.** J. Exp. Bot. 52, 403–411.
- Bennett, M.J, Marchant A, Green HG, May ST, Ward SP, Millner PA, Walker AR, Schulz B, Feldmann KA. (1996) **Arabidopsis AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism.** Science 273, 948–950
- Benkova, E, Michniewicz M, Sauer M, Teichmann T, Seifertová D, Jürgens G, Friml J. (2003) **Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation.** Cell 115, 591–602
- Benkova E, y Bielach A. (2010) **Lateral root organogenesis-from cell to organ.** Current Opinion in Plant Biology.

- Bhalerao, R.P, Eklöf J, Ljung K, Marchant A, Bennett M, Sandberg G. (2002) **Shoot-derived auxin is essential for early lateral root emergence in Arabidopsis seedlings.** Plant J. 29, 325–332.
- Bhalerao, R.P. y Bennett, M.J. (2003). **The case for morphogens in plants.** Nat. Cell Biol. 5, 939–943
- Birnbaum, K, Shasha DE, Wang JY, Jung JW, Lambert GM, Galbraith DW, Benfey PN (2003) **A gene expression map of the Arabidopsis root.** Science 302, 1956–1960
- Boerjan, W, Cervera MT, Delarue M, Beeckman T, Dewitte W, Bellini C, Caboche M, Van Onckelen H, Van Montagu M, Inzé D. (1995) **Superroot, a recessive mutation in Arabidopsis, confers auxin overproduction.** Plant Cell 7, 1405–1419.
- Bou-Torrent J, Roig-Villanova I, Martínez-García JF. (2008) **Light signaling: back to space.** Trends Plant Sci. Mar;13(3):108-14. Epub 2008 Feb 14.
- Bouazoune K, Brehm A (2006) **ATP-dependent chromatin remodeling complexes in Drosophila.** Chromosome Res. 14(4):433-49. Review.
- Brady, S.M, Orlando DA, Lee JY, Wang JY, Koch J, Dinneny JR, Mace D, Ohler U, Benfey PN. (2007) **A high-resolution root spatiotemporal map reveals dominant expression patterns.** Science 318, 801–806
- Brady SM, Sarkar SF, Bonetta D, McCourt P. (2003) **The ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3 (ABI3) gene is modulated by farnesylation and is involved in auxin signaling and lateral root development in Arabidopsis.** Plant J 34:67–75
- Breuninger, H, Rikirsch E, Hermann M, Ueda M, Laux T. (2008) **Differential expression of WOX genes mediates apical-basal axis formation in the Arabidopsis embryo.** Dev. Cell 14, 867–876.
- Büttner M, Singh KB (1997) **Arabidopsis thaliana ethylene-responsive element binding protein (AtEBP), an ethylene-inducible, GCC box DNA-binding protein interacts with an ocs element binding protein.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 May 27;94(11):5961-6.
- Carrano, A.C, Eytan E, Hershko A, Pagano M. (1999) **SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27.** Nat. Cell Biol. 1, 193–199.
- Casimiro, I, Marchant A, Bhalerao RP, Beeckman T, Dhooge S, Swarup R, Graham N, Inzé D, Sandberg G, Casero PJ, Bennett M. (2001) **Auxin transport promotes Arabidopsis lateral root initiation.** Plant Cell 13, 843–852.

- Casimiro, I, Beeckman T, Graham N, Bhalerao R, Zhang H, Casero P, Sandberg G, Bennett MJ (2003) **Dissecting Arabidopsis lateral root development.** Trends Plant Sci. 8, 165–171.
- Celenza, J.L, Grisafi PL, Fink GR. (1995) **A pathway for lateral root formation in Arabidopsis thaliana.** Genes Dev. 9, 2131–2142.
- Chunyuan Jin, Chongzhi Zang, Gang Wei, Kairong Cui, Weiqun Peng, Keji Zhao and Gary Felsenfeld (2009) **H3.3/H2A.Z double variant-containing nucleosomes mark “nucleosome-free regions” of active promoters and other regulatory regions in the human genome.** Nat Genet. August ; 41(8): 941–945. doi:10.1038/ng.409.
- Clark DG, Gubrium EK, Barrett JE, Nell TA, Klee HJ. (1999) **Root formation in ethylene-insensitive plants.** Plant Physiol 121:53–60.
- Coates, J.C, Laplaze L, Haseloff J. (2006) **Armadillo-related proteins promote lateral root development in Arabidopsis.** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103, 1621–1626
- Cosgrove, D.J. (2000) **Loosening of plant cell walls by expansins.** Nature 407, 321–326.
- Costigan SE, Warnasooriya SN, Humphries BA, Montgomery BL.(2011) **Root-localized phytochrome chromophore synthesis is required for photoregulation of root elongation and impacts root sensitivity to jasmonic acid in Arabidopsis thaliana.** Plant Physiol. Aug 29. [Epub ahead of print]
- Dharmasiri, N, Dharmasiri S, Estelle M. (2005) **The F-box protein TIR1 is an auxin receptor.** Nature 435, 441–445
- Dharmasiri, N, Dharmasiri S, Weijers D, Lechner E, Yamada M, Hobbie L, Ehrismann JS, Jürgens G, Estelle M. (2005) **Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins.** Dev. Cell 9, 109–119.
- Dinney JR, Yanofsky MF. (2005) **Drawing lines and borders: how the dehiscent fruit of Arabidopsis is patterned.** Bioessays Jan;27(1):42-9.
- Ditengou FA, Teale WD, Kochersperger P, Flittner KA, Kneuper I, van der Graaff E, Nziengui H, Pinosa F, Li X, Nitschke R, Laux T, Palme K (2008) **Mechanical induction of lateral root initiation in Arabidopsis thaliana.** Proc Natl Acad Sci U S A. Dec 2;105(48):18818-23. Epub 2008 Nov 24

- De Leon BG, Zorrilla JM, Rubio V, Dahiya P, Paz-Ares J, Leyva A. (2004) **Interallelic complementation at the Arabidopsis CRE1 locus uncovers independent pathways for the proliferation of vascular initials and canonical cytokinin signalling.** *Plant J.* 38(1):70-9.
- Dello Ioio, R, Nakamura K, Moubayidin L, Perilli S, Taniguchi M, Morita MT, Aoyama T, Costantino P, Sabatini S. (2008) **A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem.** *Science* 322, 1380–1384
- De Smet, I, Lau S, Voss U, Vanneste S, Benjamins R, Rademacher EH, Schlereth A, De Rybel B, Vassileva V, Grunewald W, Naudts M, Levesque MP, Ehrismann JS, Inzé D, Luschnig C, Benfey PN, Weijers D, Van Montagu MC, Bennett MJ, Jürgens G, Beeckman T (2010) **Bimodular auxin response controls organogenesis in Arabidopsis.** *PNAS* vol. 107 no. 6 2705–2710.
- De Smet, I, Vassileva V, De Rybel B, Levesque MP, Grunewald W, Van Damme D, Van Noorden G, Naudts M, Van Isterdael G, De Clercq R, Wang JY, Meuli N, Vanneste S, Friml J, Hilson P, Jürgens G, Ingram GC, Inzé D, Benfey PN, Beeckman T. (2008) **Receptor-like kinase ACR4 restricts formative cell divisions in the Arabidopsis root.** *Science* 322, 594–597.
- De Smet I, Tetsumura T, De Rybel B, Frey NF, Laplaze L, Casimiro I, Swarup R, Naudts M, Vanneste S, Audenaert D, Inzé D, Bennett MJ, Beeckman T. (2007) **Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of Arabidopsis.** *Development*, 134:681-690.
- De Smet, I, Vanneste S, Inzé D, Beeckman T. (2006) Lateral root initiation or the birth of a new meristem. *Plant Mol. Biol.* 60, 871–887 10.
- De Smet I, Zhang H, Inzé D, Beeckman T. (2006b) **A novel role for abscisic acid emerges from underground.** *Trends Plant Sci* 11:434–439.
- De Smet I, Signora L, Beeckman T, Inzé D, Foyer CH, Zhang H. (2003) **An abscisic acid-sensitive checkpoint in lateral root development of Arabidopsis.** *Plant J* 33:543–555.
- De Rybel B, Vassileva V, Parizot B, Demeulenaere M, Grunewald W, Audenaert D, Van Campenhout J, Overvoorde P, Jansen L, Vanneste S, Möller B, Wilson M, Holman T, Van Isterdael G, Brunoud G, Vuylsteke M, Vernoux T, De Veylder L, Inzé D, Weijers D, Bennett MJ, Beeckman T. (2010) **A Novel Aux/IAA28 Signaling Cascade Activates GATA23-Dependent Specification of Lateral Root Founder Cell Identity.** *Current Biology* 20, 1697–1706.

- Del Pozo JC, Dharmasiri S, Hellmann H, Walker L, Gray WM, Estelle M. (2002) **AXR1-ECR1-dependent conjugation of RUB1 to the Arabidopsis Cullin AtCUL1 is required for auxin response.** Plant Cell. Feb;14(2):421-33.
- Del Pozo JC, Boniotti MB, Gutierrez C. (2002) **Arabidopsis E2Fc functions in cell division and is degraded by the ubiquitin-SCF(AtSKP2) pathway in response to light.** Plant Cell. Dec;14(12):3057-71.
- Del Pozo JC, Diaz-Trivino S, Cisneros N, Gutierrez C. (2006). **The balance between cell division and endoreplication depends on E2FC-DPB, transcription factors regulated by the ubiquitin-SCFSKP2A pathway in Arabidopsis.** Plant Cell. 2006 Sep;18(9):2224-35. Epub 2006 Aug 18.
- Desgagne-Penix, I, Eakanunkul S, Coles JP, Phillips AL, Hedden P, Sponsel VM. (2005) **The auxin transport inhibitor response 3 (tir3) allele of BIG and auxin transport inhibitors affect the gibberellin status of Arabidopsis.** Plant J. 41, 231–242.
- DiDonato, R.J, Arbuckle E, Buker S, Sheets J, Tobar J, Totong R, Grisafi P, Fink GR, Celenza JL. (2004) **Arabidopsis ALF4 encodes a nuclear localized protein required for lateral root formation.** Plant J. 37, 340–353
- Ditengou, F.A, Teale WD, Kochersperger P, Flittner KA, Kneuper I, van der Graaff E, Nziengui H, Pinosa F, Li X, Nitschke R, Laux T, Palme K. (2008) **Mechanical induction of lateral root initiation in Arabidopsis thaliana.** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105, 18818–18823
- Dolan, L, Janmaat K, Willemsen V, Linstead P, Poethig S, Roberts K, Scheres B. (1993) **Cellular organisation of the Arabidopsis thaliana root.** Development 119, 71–84
- Dong, L, Wang L, Zhang Y, Zhang Y, Deng X, Xue Y. (2006) **An auxin-inducible F-box protein CEGENDUO negatively regulates auxin-mediated lateral root formation in Arabidopsis.** Plant Mol. Biol. 60, 599–615
- Dubrovsky, J.G, Rost TL, Colón-Carmona A, Doerner P. (2001) **Early primordium morphogenesis during lateral root initiation in Arabidopsis thaliana.** Planta 214, 30–36.
- Dubrovsky JG, Gambetta GA, Hernández-Barrera A, Shishkova S, González I. (2006) **Lateral root initiation in Arabidopsis: developmental window, spatial patterning, density and predictability.** Ann Bot , 97:903-915.

- Dubrovsky, J.G, Sauer M, Napsucialy-Mendivil S, Ivanchenko MG, Friml J, Shishkova S, Celenza J, Benková E. (2008) **Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells.** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A. 105, 8790–8794.
- Eckardt NA. (2006) **Medicago truncatula CRE1 cytokinin receptor regulates nodulation and lateral root development.** Plant Cell. 2006 Oct;18(10):2419.
- Ferguson BJ, Ross JJ, Reid JB. (2005) **Nodulation phenotypes of gibberellin and brassinosteroid mutants of pea.** Plant Physiol 138:2396–2405.
- Fu X, Harberd NP. (2003) **Auxin promotes Arabidopsis root growth by modulating gibberellin response.** Nature 421:740–743.
- Fukaki, H, Tameda S, Masuda H, Tasaka M. (2002) **Lateral root formation is blocked by a gain-of function mutation in the SOLITARY-ROOT/IAA14 gene of Arabidopsis.** Plant J. 29, 153–168.
- Fukaki, H, Nakao Y, Okushima Y, Theologis A, Tasaka M. (2005) **Tissue-specific expression of stabilized SOLITARY-ROOT/IAA14 alters lateral root development in Arabidopsis.** Plant J. 44, 382–395.
- Fukaki H, Taniguchi N, Tasaka M. (2006) **PICKLE is required for SOLITARY-ROOT/IAA14-mediated repression of ARF7 and ARF19 activity during Arabidopsis lateral root initiation.** Plant J 48:380–389.
- Fukaki, H, Okushima Y, Tasaka M. (2007) **Auxin-mediated lateral root formation in higher plants.** Int. Rev. Cytol. 256, 111–137
- Fukaki H, Tasaka M. Plant Mol Biol (2009) 69:437–449.
- Franco-Zorrilla JM, Martín AC, Leyva A, Paz-Ares J. (2005) **Interaction between phosphate-starvation, sugar, and cytokinin signaling in Arabidopsis and the roles of cytokinin receptors CRE1/AHK4 and AHK3.** Plant Physiol. Jun;138 (2):847-57. Epub 2005 May 27.
- Friml, J, Vieten A, Sauer M, Weijers D, Schwarz H, Hamann T, Offringa R, Jürgens G. (2003) **Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of Arabidopsis.** Nature 426, 147–153.
- Galen C, Rabenold JJ, Liscum E (2007) **Functional ecology of a blue light photoreceptor: effects of phototropin-1 on root growth enhance drought tolerance in Arabidopsis thaliana.** New Phytol 173: 91-99

- eldner, N, Richter S, Vieten A, Marquardt S, Torres-Ruiz RA, Mayer U, Jürgens G. (2004) **Partial loss-of-function alleles reveal a role for GNOM in auxin transport-related, post-embryonic development of Arabidopsis.** Development 131, 389–400.
- Gonzalez-Carranza ZH, Elliott KA, Roberts JA. (2007) **Expression of polygalacturonases and evidence to support their role during cell separation processes in Arabidopsis thaliana.** Journal of Experimental Botany 58, 3719–3730.
- Gonzalez-Rizzo S, Crespi M, Frugier F. (2006) **The Medicago truncatula CRE1 cytokinin receptor regulates lateral root development and early symbiotic interaction with Sinorhizobium meliloti.** Plant Cell 18:2680–2693.
- Gray WM, del Pozo JC, Walker L, Hobbie L, Risseuw E, Banks T, Crosby WL, Yang M, Ma H, Estelle M (1999) **Identification of an SCF ubiquitin-ligase complex required for auxin response in Arabidopsis thaliana.** Genes Dev. 1999 Jul 1;13(13):1678-91.
- Gray, W.M, Muskett PR, Chuang HW, Parker JE. (2003) **Arabidopsis SGT1b is required for SCF(TIR1)-mediated auxin response.** Plant Cell 15, 1310–1319
- Guilfoyle, T.J. and Hagen, G. (2007) **Auxin response factors.** Curr. Opin. Plant Biol. 10, 453–460
- Haecker, A, Gross-Hardt R, Geiges B, Sarkar A, Breuninger H, Herrmann M, Laux T. (2004) **Expression dynamics of WOX genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in Arabidopsis thaliana.** Development 131, 657-668.
- Hayashi K, Tan X, Zheng N, Hatate T, Kimura Y, Kepinski S, Nozaki H (2008) **Small-molecule agonists and antagonists of F-box protein-substrate interactions in auxin perception and signaling.** Proc Natl Acad Sci U S A. Apr 8;105(14):5632-7. Epub 2008 Apr 7.
- He XJ, Mu RL, Cao WH, Zhang ZG, Zhang JS, Chen SY. (2005) **AtNAC2, a transcription factor downstream of ethylene and auxin signaling pathways, is involved in salt stress response and lateral root development.** Plant J. 2005 Dec;44(6):903-16.
- Heidstra R, Welch D, Scheres B. (2004) **Mosaic analyses using marked activation and deletion clones dissect Arabidopsis SCARECROW action in asymmetric cell division.** Genes Dev. Aug 15;18(16):1964-9.

- Henikoff S, Furuyama T, Ahmad K. (2004) **Histone variants, nucleosome assembly and epigenetic inheritance.** Trends Genet. 2004 Jul;20(7):320-6.
- Henrissat, B. (1991) **A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities.** Biochem. J. 280, 309–316
- Higuchi M (2004) **In planta functions of the Arabidopsis cytokinin receptor family.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Jun 8;101(23):8821-6.
- Himanen, K, Boucheron E, Vanneste S, de Almeida Engler J, Inzé D, Beeckman T. (2002) **Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation.** Plant Cell 14, 2339–2351
- Hirota, A, Kato T, Fukaki H, Aida M, Tasaka M. (2007) **The auxin-regulated AP2/EREBP gene PUCHI is required for morphogenesis in the early lateral root primordium of Arabidopsis.** Plant Cell 19, 2156–2168
- Hobbie, L. (2006) **Auxin and cell polarity: the emergence of AXR4.** Trends Plant Sci. 11, 517–518
- Hobbie, L, McGovern M, Hurwitz LR, Pierro A, Liu NY, Bandyopadhyay A, Estelle M. (2000) **The *axr6* mutants of Arabidopsis thaliana define a gene involved in auxin response and early development.** Development 127, 23-32
- Hobbie L and Estelle M. (1995) **The *axr4* auxin-resistant mutants of Arabidopsis thaliana define a gene important for root gravitropism and lateral root initiation.** Plant J. 1995 Feb;7(2):211-20.
- Hochholdinger, F, Park WJ, Sauer M, Woll K. (2004) **From weeds to crops: genetic analysis of root development in cereals.** Trends Plant Sci. 9, 42–48.
- Hutchison CE, Li J, Argueso C, Gonzalez M, Lee E, Lewis MW, Maxwell BB, Perdue TD, Schaller GE, Alonso JM, Ecker JR, Kieber JJ. (2006) **The Arabidopsis histidine phosphotransfer proteins are redundant positive regulators of cytokinin signaling.** Plant Cell 18:3073–3087.
- Irshad M, Canut H, Borderies G, Pont-Lezica R, Jamet E. (2008) **A new picture of cell wall protein dynamics in elongating cells of Arabidopsis thaliana: confirmed actors and newcomers.** BMC Plant Biol. Sep 16; 8:94.
- Ivanchenko, M.G, Muday GK, Dubrovsky JG. (2008) **Ethylene-auxin interactions regulate lateral root initiation and emergence in Arabidopsis thaliana.** Plant J. 55, 335–341

- Ivanchenko M.G, Coffeen WC, Lomax TL, Dubrovsky JG. (2006) **Mutations in the Diageotropica (Dgt) gene uncouple patterned cell division during lateral root initiation from proliferative cell division in the pericycle.** Plant J 46:436–447.
- Jiao Y, Ma L, Strickland E, Deng XW (2005) **Conservation and divergence of light-regulated genome expression patterns during seedling development in rice and Arabidopsis.** Plant Cell 17: 3239-3256
- Jurado S, Díaz-Triviño S, Abraham Z, Manzano C, Gutierrez C, del Pozo C. (2008) **SKP2A, an F-box protein that regulates cell division, is degraded via the ubiquitin pathway.** Plant J. 2008 Mar;53(5):828-41. Epub 2007 Nov 23.
- Jurado S, Abraham Z, Manzano C, López-Torrejón G, Pacios LF, Del Pozo JC. (2010) **The Arabidopsis cell cycle F-box protein SKP2A binds to auxin.** Plant Cell. 2010 Dec;22(12):3891-904. Epub 2010 Dec 7.
- Kamakaka R.T., Biggins S. (2005) **Histone variants: deviants?** Genes Dev. 19 295–310.
- Kamura, T, Hara T, Matsumoto M, Ishida N, Okumura F, Hatakeyama S, Yoshida M, Nakayama K, Nakayama KI. (2004b) **Cytoplasmic ubiquitin ligase KPC regulates proteolysis of p27Kip1 at G1 phase.** Nat. Cell Biol. 6, 1229–1235.
- Kang RS, Daniels CM, Francis SA, Shih SC, Salerno WJ, Hicke L, Radhakrishnan I. (2003) **Solution structure of a CUE-ubiquitin complex reveals a conserved mode of ubiquitin binding.** Cell. May 30;113(5):621-30.
- Kaya H, Shibahara KI, Taoka KI, Iwabuchi M, Stillman B, Araki T (2001) **FASCIATA genes for chromatin assembly factor-1 in arabidopsis maintain the cellular organization of apical meristems.** Cell. Jan 12;104(1):131-42
- Kawasaki T, Nam J, Boyes DC, Holt BF 3rd, Hubert DA, Wiig A, Dangl JL. (2005) **A duplicated pair of Arabidopsis RING-finger E3 ligases contribute to the RPM1- and RPS2-mediated hypersensitive response.** Plant J. 2005 Oct;44(2):258-70.
- Kepinski, S. and Leyser, O. (2005) **The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor.** Nature 435, 446–451.
- Kornet N, Scheres B. **Stem cell factors in plants: chromatin connections** (2009) Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2008;73:235-42. Epub Jan 15. Review.

- Kuderova A, Urbánková I, Válková M, Malbeck J, Brzobohaty B, Némethová D, Hejátko J. (2008) **Effects of conditional IPT-dependent cytokinin overproduction on root architecture of Arabidopsis seedlings.** *Plant Cell Physiol* 49:570–582
- Kurup, S, Runions J, Köhler U, Laplace L, Hodge S, Haseloff J. (2005) **Marking cell lineages in living tissues.** *Plant J.* 42, 444–453.
- Laplace, L, Parizot B, Baker A, Ricaud L, Martinière A, Auguy F, Franche C, Nussaume L, Bogusz D, Haseloff J. (2005) **GAL4-GFP enhancer trap lines for genetic manipulation of lateral root development in Arabidopsis thaliana.** *J.Exp. Bot.* 56, 2433–2442
- Laplace, L, Benkova E, Casimiro I, Maes L, Vanneste S, Swarup R, Weijers D, Calvo V, Parizot B, Herrera-Rodriguez MB, Offringa R, Graham N, Doumas P, Friml J, Bogusz D, Beeckman T, Bennett M. (2007) **Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation.** *Plant Cell* 19, 3889–3900
- Laskowski, M, Grieneisen VA, Hofhuis H, Hove CA, Hogeweg P, Marée AF, Scheres B. (2008) **Root system architecture from coupling cell shape to auxin transport.** *PLoS Biol.* 6, e307
- Laskowski, M, Biller S, Stanley K, Kajstura T, Prusty R. (2006) **Expression profiling of auxin-treated Arabidopsis roots: toward a molecular analysis of lateral root emergence.** *Plant Cell Physiol.* 47, 788–79267
- Laskowski, M.J, Williams ME, Nusbaum HC, Sussex IM. (1995) **Formation of lateral root meristems is a two-stage process.** *Development* 121, 3303–3310.
- Leasure CD, Tong H, Yuen G, Hou X, Sun X, He Z-H (2009) **ROOT UV-B SENSITIVE2 acts with ROOT UV-B SENSITIVE1 in a root ultraviolet B sensing pathway.** *Plant Physiol* 150: 1902-1915
- Lehar, J, Stockwell BR, Giaever G, Nislow C. (2008) **Combination chemical genetics.** *Nat. Chem. Biol.* 4, 674–681.
- Lewandowska M, Wawrzynska A, Moniuszko G, Lukomska J, Zientara K, Piecho M, Hodurek P, Zhukov I, Liszewska F, Nikiforova V, Sirko A. (2010) **A contribution to identification of novel regulators of plant response to sulfur deficiency: characteristics of a tobacco gene UP9C, its protein product and the effects of UP9C silencing.** *Mol Plant.* 2010 Mar;3(2):347-60. Epub Feb 10.
- Li L, Xu J, Xu ZH, Xue HW. (2005) **Brassinosteroids stimulate plant tropisms through modulation of polar auxin transport in Brassica and Arabidopsis.** *Plant Cell* 17:2738–2753.

- Li X, Mo X, Shou H, Wu P. (2006) **Cytokinin-mediated cell cycling arrest of pericycle founder cells in lateral root initiation of Arabidopsis.** Plant Cell Physiol 47:1112–1123
- Li, J, Mo X, Wang J, Chen N, Fan H, Dai C, Wu P. (2009) **BREVIS RADIX is involved in cytokinin-mediated inhibition of lateral root initiation in Arabidopsis.** Planta 229, 593–603
- Ljung K., Hull AK, Celenza J, Yamada M, Estelle M, Normanly J, Sandberg G. (2005) **Sites and regulation of auxin biosynthesis in Arabidopsis roots.** The Plant Cell 17, 1090–1104
- Lloret, P.G. (2002) **Lateral root initiation in Plant Roots.** The Hidden Hal. (3rd edn) (Waisel, Y. *et al.*, eds), pp. 127–156, Marcel Dekker.
- Lincoln, C, Britton JH, Estelle M. (1990) **Growth and development of the axr1 mutants of Arabidopsis.** Plant Cell 2, 1071–1080
- Ljung, K, Hull AK, Celenza J, Yamada M, Estelle M, Normanly J, Sandberg G. (2005) **Sites and regulation of auxin biosynthesis in Arabidopsis roots.** Plant Cell 17, 1090–1104
- Lucas M, Swarup R, Paponov IA, Swarup K, Casimiro I, Lake D, Peret B, Zappala S, Mairhofer S, Whitworth M, Wang J, Ljung K, Marchant A, Sandberg G, Holdsworth MJ, Palme K, Pridmore T, Mooney S, Bennett MJ. (2011) **SHORT-ROOT Regulates Primary, Lateral, and Adventitious Root Development in Arabidopsis.** Plant Physiology Vol. 155, pp. 384–398
- Lucas, M, Guédon Y, Jay-Allemand C, Godin C, Laplaze L. (2008) **An auxin transport-based model of root branching in Arabidopsis thaliana.** PLoS One 3, e3673.
- Lohar DP, Schaff JE, Laskey JG, Kieber JJ, Bilyeu KD, Bird DM. (2004) **Cytokinins play opposite roles in lateral root formation, and nematode and Rhizobial symbioses.** Plant J 38:203–214.
- López-Bucio J, Hernández-Abreu E, Sánchez-Calderón L, Nieto-Jacobo MF, Simpson J, Herrera-Estrella L (2002). **Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the Arabidopsis root system.** Plant Physiol. May;129(1):244-56.
- Ma L, Sun N, Liu X, Jiao Y, Zhao H, Deng XW (2005) **Organ-specific expression of Arabidopsis genome during development.** Plant Physiol 138: 80-91.
- Magidin, M, Pittman JK, Hirschi KD, Bartel B. (2003) **ILR2, a novel gene regulating IAA conjugate sensitivity and metal transport in Arabidopsis thaliana.** Plant J. 35, 523–534.

- McKittrick E, Gafken PR, Ahmad K, Henikoff S. (2004) **Histone H3.3 is enriched in covalent modifications associated with active chromatin.** Proc Natl Acad Sci U S A. Feb 10;101(6):1525-30. Epub 2004 Jan 19.
- Malamy, J.E. and Benfey, P.N. (1997) **Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*.** Development 124, 33–44
- Mallory, A, Bartel DP, Bartel B. (2005) **MicroRNA-directed regulation of *Arabidopsis* AUXIN RESPONSE FACTOR17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes.** Plant Cell 17, 1360–1375.
- Mandoli DF, Briggs WR (1982) **The photoperceptive sites and the function of tissue light-piping in photomorphogenesis of etiolated oat seedlings.** Plant Cell Environ 5: 137-145
- Marchant A, Bhalerao R, Casimiro I, Eklöf J, Casero PJ, Bennett M, Sandberg G. (2002) **AUX1 promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the *Arabidopsis* seedling.** Plant Cell. Mar;14(3):589-97.
- Maruyama-Nakashita A, Nakamura Y, Yamaya T, Takahashi H (2004) **Regulation of high-affinity sulphate transporters in plants: towards systematic analysis of sulphur signalling and regulation.** J Exp Bot. Aug;55(404):1843-9. Epub 2004 Jun 18. Review.
- Mason MG, Mathews DE, Argyros DA, Maxwell BB, Kieber JJ, Alonso JM, Ecker JR, Schaller GE (2005) **Multiple type-B response regulators mediate cytokinin signal transduction in *Arabidopsis*.** Plant Cell 17:3007–3018
- Marín-Rodríguez, M.C, Orchard J, Seymour GB. (2002) **Pectate lyases, cell wall degradation and fruit softening.** J. Exp. Bot. 53, 2115–2119.
- Mito Y, Henikoff JG, Henikoff S. (2005) **Genome-scale profiling of histone H3.3 replacement patterns.** Nat Genet. Oct;37(10):1090-7. Epub 2005 Sep 11.
- Monroe-Augustus M, Zolman BK, Bartel B. (2003) **IBR5, a dual specificity phosphatase-like protein modulating auxin and abscisic acid responsiveness in *Arabidopsis*.** Plant Cell 15:2979–2991.
- Moreno-Risueno, M.A., Van Norman, J.M., Moreno, A., Zhang, J., Ahnert, S.E., and Benfey, P.N. (2010). **Oscillating gene expression determines competence for periodic *Arabidopsis* root branching.** Science 329: 1306–1311

akamoto D, Ikeura A, Asami T, Yamamoto KT. (2006) **Inhibition of brassinosteroid biosynthesis by either a dwarf4 mutation or a brassinosteroid biosynthesis inhibitor rescues defects in tropic responses of hypocotyls in the arabidopsis mutant nonphototropic hypocotyl.** Plant Physiol 141:456–464

Nakamura A, Higuchi K, Goda H, Fujiwara MT, Sawa S, Koshiba T, Shimada Y, Yoshida S. (2003) **Brassinolide induces IAA5, IAA19, and DR5, a synthetic auxin response element in Arabidopsis, implying a cross talk point of brassinosteroid and auxin signaling.** Plant Physiol 133:1843–1853.

Nakamura A, Nakajima N, Goda H, Shimada Y, Hayashi K, Nozaki H, Asami T, Yoshida S, Fujioka S. (2006) **Arabidopsis Aux/IAA genes are involved in brassinosteroid-mediated growth responses in a manner dependent on organ type.** Plant J 45:193–205.

Nakano T, Suzuki K, Ohtsuki N, Tsujimoto Y, Fujimura T, Shinshi H (2006) **Identification of genes of the plant-specific transcription-factor families cooperatively regulated by ethylene and jasmonate in Arabidopsis thaliana.** J Plant Res. Jul;119(4):407-13. Epub 2006 Jul 5.

Nakazawa, M, Yabe N, Ichikawa T, Yamamoto YY, Yoshizumi T, Hasunuma K, Matsui M. (2001) **DFL1, an auxin-responsive GH3 gene homologue, negatively regulates shoot cell elongation and lateral root formation, and positively regulates the light response of hypocotyl length.** Plant J. 25, 213–221

Negi, S, Ivanchenko MG, Muday GK. (2008) **Ethylene regulates lateral root formation and auxin transport in Arabidopsis thaliana.** Plant J. 55, 175–187

Neuteboom, L.W, Veth-Tello LM, Clijdesdale OR, Hooykaas PJ, van der Zaal BJ. (1999) **A novel subtilisin-like protease gene from Arabidopsis thaliana is expressed at sites of lateral root emergence.** DNA Res. 6, 13–19.

Nieuwland, J, Maughan S, Dewitte W, Scofield S, Sanz L, Murray JA. (2009). **The D-type cyclin CYCD4;1 modulates lateral root density in Arabidopsis by affecting the basal meristem region.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106: 22528–22533.

Nordstrom A, Tarkowski P, Tarkowska D, Norbaek R, Astot C, Dolezal K, Sandberg G. (2004) **Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in Arabidopsis thaliana: a factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development.** Proc Natl Acad Sci USA 101:8039–8044.

- Nodzon, L.A, Xu WH, Wang Y, Pi LY, Chakrabarty PK, Song WY (2004) **The ubiquitin ligase XBAT32 regulates lateral root development in Arabidopsis.** Plant J. 40, 996–1006
- Nordstrom A, Tarkowski P, Tarkowska D, Norbaek R, Astot C, Dolezal K, Sandberg G. (2004) **Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in Arabidopsis thaliana: a factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development.** Proc Natl Acad Sci USA 101:8039–8044.
- Ogawa M, Kay P, Wilson S, Swain SM. (2009) **ARABIDOPSIS DEHISCENCE ZONE POLYGALACTURONASE1 (ADPG1), ADPG2, and QUARTET2 are polygalacturonases required for cell separation during reproductive development in Arabidopsis.** The Plant Cell 21, 216–233.
- Oh, K, Ivanchenko MG, White TJ, Lomax TL. (2006) **The diageotropica gene of tomato encodes a cyclophilin: a novel player in auxin signaling.** Planta 224:133–144.
- Okushima, Y, Fukaki H, Onoda M, Theologis A, Tasaka M. (2007) **ARF7 and ARF19 regulate lateral root formation via direct activation of LBD/ASL genes in Arabidopsis.** Plant Cell 19, 118–130
- Okushima, Y, Overvoorde PJ, Arima K, Alonso JM, Chan A, Chang C, Ecker JR, Hughes B, Lui A, Nguyen D, Onodera C, Quach H, Smith A, Yu G, Theologis A. (2005) **Functional genomic analysis of the AUXIN RESPONSE FACTOR gene family members in Arabidopsis thaliana: unique and overlapping functions of ARF7 and ARF19.** Plant Cell 17, 444–463.
- Ohme-Takagi M, Shinshi H (1995) Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. Plant Cell.Feb;7(2):173-82
- Osmont, K.S, Sibout R, Hardtke CS. (2007) **Hidden branches: developments in root system architecture.** Annu. Rev. Plant Biol. 58, 93–113
- Ottenschlager, I, Wolff P, Wolverton C, Bhalerao RP, Sandberg G, Ishikawa H, Evans M, Palme K. (2003) **Gravity-regulated differential auxin transport from columella to lateral root cap cells.** Proc. Natl. Acad. Sci.U. S. A. 100, 2987–2991
- Parizot, B, Laplaze L, Ricaud L, Boucheron-Dubuisson E, Bayle V, Bonke M, De Smet I, Poethig SR, Helariutta Y, Haseloff J, Chriqui D, Beeckman T, Nussaume L. (2008) **Diarch symmetry of the vascular bundle in Arabidopsis root encompasses the pericycle and is reflected in distich lateral root initiation.** Plant Physiol. 146, 140–14816.

- ark WJ, Hochholdinger F, Gierl A. (2004) **Release of the benzoxazinoids defense molecules during lateral- and crown root emergence in Zea mays**. Journal of Plant Physiology 161, 981–985.
- Peret B, Larrieu A, Bennett MJ. (2009) **Lateral root emergence: a difficult birth**. J Exp Botany 60(13):3637-43.
- Phelps-Durr TL, Thomas J, Vahab P, Timmermans MC (2005) **Maize rough sheath2 and its Arabidopsis orthologue ASYMMETRIC LEAVES1 interact with HIRA, a predicted histone chaperone, to maintain knox gene silencing and determinacy during organogenesis**. Plant Cell. 2005 Nov;17(11):2886-98. EpubOct 21.
- Prasad ME, Schofield A, Lyzenga W, Liu H, Stone SL. (2010) **Arabidopsis RING E3 ligase XBAT32 Regulates Lateral Root Production through its Role in Ethylene Biosynthesis**. Plant Physiol.2010 Aug;153(4):1587-96.
- Pérez-Torres, C.A, López-Bucio J, Cruz-Ramírez A, Ibarra-Laclette E, Dharmasiri S, Estelle M, Herrera-Estrella L. (2008) **Phosphate availability alters lateral root development in Arabidopsis by modulating auxin sensitivity via a mechanism involving the TIR1 auxin receptor**. Plant Cell 20, 3258–3272
- Polo, S.E. and Almouzni, G. (2006) **Chromatin assembly, a basic recipe with various flavours**. Curr. Opin. Genet. Dev. 16, 104–111
- Rampey, R.A, LeClere S, Kowalczyk M, Ljung K, Sandberg G, Bartel B. (2004) **A family of auxin-conjugate hydrolases that contributes to free indole-3-acetic acid levels during Arabidopsis germination**. Plant Physiol. 135, 978–988
- Remans, T, Nacry P, Pervent M, Filleur S, Diatloff E, Mounier E, Tillard P, Forde BG, Gojon A. (2006) **The Arabidopsis NRT1.1 transporter participates in the signaling pathway triggering root colonization of nitrate-rich patches**. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 103, 19206–19211
- Riefler M, Novak O, Strnad M, Schmülling T. (2006) **Arabidopsis cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism**. Plant Cell 18:40–54.
- Richter, G.L, Monshausen GB, Krol A, Gilroy S. (2009). **Mechanical stimuli modulate lateral root organogenesis**. Plant Physiol.151: 1855–1866.
- Robert, H.S. and Offringa, R. (2008) **Regulation of auxin transport polarity by AGC kinases**. Curr. Opin. Plant Biol. 11, 495–502

- Roberts, J.A, Elliott KA, Gonzalez-Carranza ZH. (2002) **Abscission, dehiscence, and other cell separation processes.** Annu. Rev. Plant Biol. 53, 131–158
- Rogg, L.E, Lasswell J, Bartel B. (2001) **A gain-of-function mutation in IAA28 suppresses lateral root development.** Plant Cell 13, 465–480.
- Sabatini, S, Heidstra R, Wildwater M, Scheres B. (2003) **SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the Arabidopsis root meristem.** Genes dev. Feb 1;17(3):354-8.
- Salisbury FJ, Hall A, Grierson CS, Halliday KJ (2007) **Phytochrome coordinates Arabidopsis shoot and root development.** Plant J 50: 429-438
- Santelia, D, Vincenzetti V, Azzarello E, Bovet L, Fukao Y, Düchtig P, Mancuso S, Martinoia E, Geisler M. (2005) **MDR-like ABC transporter AtPGP4 is involved in auxin-mediated lateral root and root hair development.** FEBS Lett 579, 5399–5406
- Scheres, B (1995) **Mutations affecting the radial organisation of the Arabidopsis root display specific defects throughout the embryonic axis.** Development 121, 53–62
- Scheres, B. and Benfey, P.N. (1999) **Asymmetric cell division in plants.** Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 50, 505–537.
- Schlereth A, Möller B, Liu W, Kientz M, Flipse J, Rademacher EH, Schmid M, Jürgens G, Weijers D (2010) **MONOPTEROS controls embryonic root initiation by regulating a mobile transcription factor.** Nature. Apr 8;464(7290):913-6. Epub 2010 Mar 10.
- Scimone ML, Meisel J, Reddien PW (2010) The Mi-2-like Smed-CHD4 gene is required for stem cell differentiation in the planarian Schmidtea mediterranea. Development. Apr;137(8):1231-41. Epub 2010 Mar 10.
- Seo, M, Akaba S, Oritani T, Delarue M, Bellini C, Caboche M, Koshiba T. (1998) **Higher activity of an aldehyde oxidase in the auxin-overproducing *superroot1* mutant of Arabidopsis thaliana.** Plant Physiol. 116, 687–693
- Shih SC, Prag G, Francis SA, Sutanto MA, Hurley JH, Hicke L. (2003) **A ubiquitin-binding motif required for intramolecular monoubiquitylation, the CUE domain.** EMBO J. Mar 17;22(6):1273-81.
- Shin R, Burch AY, Huppert KA, Tiwari SB, Murphy AS, Guilfoyle TJ, Schachtman DP. (2007) **The Arabidopsis transcription factor MYB77 modulates auxin signal transduction.** Plant Cell 19:2440–2453.

- ignora L, De Smet I, Foyer CH, Zhang H. (2001) **ABA plays a central role in mediating the regulatory effects of nitrate on root branching in Arabidopsis**. Plant J 28:655–662.
- Sprague SJ, Watt M, Kirkegaard JA, Howlett BJ. (2007). **Pathways of infection of Brassica napus roots by Leptosphaeria maculans**. New Phytologist 176, 211–222. Spring DR. 2005. Chemical genetic.
- Steinmann, T, Geldner N, Grebe M, Mangold S, Jackson CL, Paris S, Gälweiler L, Palme K, Jürgens G. (1999) **Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF**. Science 286, 316–318.
- Strader LC, Monroe-Augustus M, Bartel B. (2008) **The IBR5 phosphatase promotes Arabidopsis auxin responses through a novel mechanism distinct from TIR1-mediated repressor degradation**. BMC Plant Biol 8:41.
- Sutterluty, H, Chatelain E, Marti A, Wirbelauer C, Senften M, Müller U, Krek W. (1999) **p45SKP2 promotes p27Kip1 degradation and induces S phase in quiescent cells**. Nat. Cell Biol. 1,207–214.
- Swarup, K, Benková E, Swarup R, Casimiro I, Péret B, Yang Y, Parry G, Nielsen E, De Smet I, Vanneste S, Levesque MP, Carrier D, James N, Calvo V, Ljung K, Kramer E, Roberts R, Graham N, Marillonnet S, Patel K, Jones JD, Taylor CG, Schachtman DP, May S, Sandberg G, Benfey P, Friml J, Kerr I, Beeckman T, Laplace L, Bennett MJ. (2008) **The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence**. Nat. Cell Biol. 10, 946–954
- Swarup R, Kramer EM, Perry P, Knox K, Leyser HM, Haseloff J, Beemster GT, Bhalerao R, Bennett MJ. (2005) **Root gravitropism requires lateral root cap and epidermal cells for transport and response to a mobile auxin signal**. Nat. Cell Biol. 7, 1057–1065.
- Szemenyei H, Hannon M, Long JA. (2008) **TOPLESS mediates auxin dependent transcriptional repression during Arabidopsis embryogenesis**. Science 31:1384–1386
- Takase, T, Nakazawa M, Ishikawa A, Kawashima M, Ichikawa T, Takahashi N, Shimada H, Manabe K, Matsui M. (2004) **ydk1-D, an auxin-responsive GH3 mutant that is involved in hypocotyl and root elongation**. Plant J. 37, 471–483

- Tatematsu, K, Kumagai S, Muto H, Sato A, Watahiki MK, Harper RM, Liscum E, Yamamoto KT. (2004) **MASSUGU2 encodes Aux/IAA19, an auxin-regulated protein that functions together with the transcriptional activator NPH4/ARF7 to regulate differential growth responses of hypocotyl and formation of lateral roots in Arabidopsis thaliana.** Plant Cell 16, 379–393.
- Ten Hove C, Willemsen V, de Vries WJ, van Dijken A, Scheres B, Heidstra R. (2010) **SCHIZORIZA encodes a nuclear factor regulating asymmetry of stem cell divisions in the Arabidopsis root.** Curr Biol. Mar 9;20(5):452-7.
- Tong H, Leasure CD, Hou X, Yuen G, Briggs W, He Z-H (2008) **Role of root UV-B sensing in Arabidopsis early seedling development.** Proc Natl Acad Sci U S A 105: 21039-21044.
- Tester M, Morris C (1987) **The penetration of light through soil.** Plant Cell Environ 10: 281-286.
- Tóth R, Kevei E, Hall A, Millar AJ, Nagy F, Kozma-Bognár L (2001) **Circadian clock-regulated expression of phytochrome and cryptochrome genes in Arabidopsis.** Plant Physiol 127: 1607-1616
- Tian, C.E, Muto H, Higuchi K, Matamura T, Tatematsu K, Koshiba T, Yamamoto KT. (2004) **Disruption and overexpression of auxin response factor 8 gene of Arabidopsis affect hypocotyl elongation and root growth habit, indicating its possible involvement in auxin homeostasis in light condition.** Plant J. 40, 333–343
- Tian, Q. and Reed, J.W. (1999) **Control of auxin-regulated root development by the Arabidopsis thaliana SHY2/IAA3 gene.** Development 126, 711–721
- Tiwari, S.B, Hagen G, Guilfoyle T. (2003) **The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription.** Plant Cell 15, 533–543.
- Tiwari, S.B, Hagen G, Guilfoyle TJ. (2004) **Aux/IAA proteins contain a potent transcriptional repression domain.** Plant Cell 16, 533–543.
- To JP, Haberer G, Ferreira FJ, Deruère J, Mason MG, Schaller GE, Alonso JM, Ecker JR, Kieber JJ. (2004) **Type-A Arabidopsis response regulators are partially redundant negative regulators of cytokinin signaling.** Plant Cell 16:658–671.
- Tsumoto Y, Yoshizumi T, Kuroda H, Kawashima M, Ichikawa T, Nakazawa M, Yamamoto N, Matsui M. (2006) **Light-dependent polyploidy control by a CUE protein variant in Arabidopsis.** Plant Mol Biol. Jul;61(4-5):817-28.

ehara, T, Okushima Y, Mimura T, Tasaka M, Fukaki H. (2008) **Domain II mutations in CRANE/IAA18 suppress lateral root formation and affect shoot development in Arabidopsis thaliana.** Plant Cell Physiol. 49, 1025–1038

Ulmasov, T, Murfett J, Hagen G, Guilfoyle TJ. (1997) **Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements.** Plant Cell. 1997 Nov;9(11):1963-71.

Vanneste, S, De Rybel B, Beemster GT, Ljung K, De Smet I, Van Isterdael G, Naudts M, Iida R, Gruissem W, Tasaka M, Inzé D, Fukaki H, Beeckman T. (2005) **Cell cycle progression in the pericycle is not sufficient for SOLITARY ROOT/IAA14-mediated lateral root initiation in Arabidopsis thaliana.** Plant Cell 17, 3035–3050

Vissenberg, K, Fry SC, Pauly M, Höfte H, Verbelen JP. (2005) **XTH acts at the microfibril-matrix interface during cell elongation.** J. Exp. Bot. 56, 673–683

Wang, J.W, Wang LJ, Mao YB, Cai WJ, Xue HW, Chen XY. (2005) **Control of root cap formation by microRNA targeted auxin response factors in Arabidopsis.** Plant Cell 17, 2204–2216

Weijers D, Schlereth A, Ehrismann JS, Schwank G, Kientz M, Jürgens G. (2006) **Auxin triggers transient local signaling for cell specification in Arabidopsis embryogenesis.** Dev Cell 10:265–270.

Weijers, D, Benkova E, Jäger KE, Schlereth A, Hamann T, Kientz M, Wilmoth JC, Reed JW, Jürgens G. (2005) **Developmental specificity of auxin response by pairs of ARF and Aux/IAA transcriptional regulators.** EMBO J. 24,1874–1885

Werner T, Motyka V, Laucou V, Smets R, Van Onckelen H, Schmülling T. (2003) **Cytokinin-deficient transgenic Arabidopsis plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity.** Plant Cell 15:2532–2550.

West G, Inzé D, Beemster GT. (2004) **Cell cycle modulation in the response of the primary root of Arabidopsis to salt stress.** Plant Physiol. 2004 Jun;135(2):1050-8. Epub 2004 Jun 4.

Willemsen V, Bauch M, Bennett T, Campilho A, Wolkenfelt H, Xu J, Haseloff J, Scheres B (2008) **The NAC domain transcription factors FEZ and SOMBRERO control the orientation of cell division plane in Arabidopsis root stem cells.** Dev Cell. Dec;15(6):913-22.

- Wilmoth, J.C, Wang S, Tiwari SB, Joshi AD, Hagen G, Guilfoyle TJ, Alonso JM, Ecker JR, Reed JW. (2005) **NPH4/ARF7 and ARF19 promote leaf expansion and auxin-induced lateral root formation**. Plant J. 43, 118–130.
- Wilson AK, Pickett FB, Turner JC, Estelle M. (1990) **A dominant mutation in Arabidopsis confers resistance to auxin, ethylene and abscisic acid**. Mol Gen Genet 222:377–383
- Vijaybhaskar V, Subbiah V, Kaur J, Vijayakumari P, Siddiqi I. (2008). **Identification of a root-specific glycosyltransferase from Arabidopsis and characterization of its promoter**. J Biosci. 2008 Jun;33(2):185-93
- Wen, F.(2006) **Cell separation in roots**. Ann. Plant Rev. 25, 91–105.
- West G, Inzé D, Beemster GT (2004) Cell cycle modulation in the response of the primary root of Arabidopsis to salt stress. Plant Physiol. 2004 Jun;135(2):1050-8. Epub Jun 4.
- Winter, D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ. (2007) **An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets**. PLoS One. 2007 Aug 8;2(8):e718.
- Woodward AW, Bartel B (2005) **Auxin: regulation, action, and interaction**. Ann Bot. Apr;95(5):707-35. Epub 2005 Mar 4. Review.
- Wu, G, Lewis DR, Spalding EP. (2007) **Mutations in Arabidopsis multidrug resistancelike ABC transporters separate the roles of acropetal and basipetal auxin transport in lateral root development**. Plant Cell 19, 1826–1837
- Xie, Q, Guo HS, Dallman G, Fang S, Weissman AM, Chua NH. (2002) **SINAT5 promotes ubiquitin-related degradation of NAC1 to attenuate auxin signals**. Nature 419, 167–170
- Yang, X, Lee S, So JH, Dharmasiri S, Dharmasiri N, Ge L, Jensen C, Hangarter R, Hobbie L, Estelle M. (2004) **The IAA1 protein is encoded by AXR5 and is a substrate of SCF(TIR1)**. Plant J. 40, 772–782
- Yang, S, Wang S, Liu X, Yu Y, Yue L, Wang X, Hao D. (2009) **Four divergent Arabidopsis ethylene-responsive element-binding factor domains bind to a target DNA motif with a universal CG step core recognition and different flanking bases preference**. The FEBS Journal. 276 7177–7186.

ant L, Mathieu J, Schmid M. (2009) **Just say no: floral repressors help Arabidopsis bide the time.** Curr Opin Plant Biol.Oct;12(5):580-6. Epub 2009 Aug 18.

Zhang H, Forde BG (2000) **Regulation of Arabidopsis root development by nitrate availability.** J Exp Bot.Jan;51(342):51-9.

Zenser, N, Ellsmore A, Leasure C, Callis J. (2001) **Auxin modulates the degradation rate of Aux/IAA proteins.** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98, 11795–11800.

Zolla G, Heimer YM, Barak S. (2010) **Mild salinity stimulates a stress-induced morphogenic response in Arabidopsis thaliana roots.** J Exp Bot. 2010; 61(1):211-24.

